IMMUNOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BLUTGERINNUNG DER SCHABE LEUCOPHAEA MADERAE. NACHWEIS DER GERINNUNGSPROTEINE. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PLASMA-GERINNUNGSPROTEINS.

Barbara Barwig

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546002_0007

IMMUNOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BLUTGERINNUNG DER SCHABE LEUCOPHAEA MADERAE. NACHWEIS DER GERINNUNGSPROTEINE. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PLASMA-GERINNUNGSPROTEINS.

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Barbara Barwig
aus
Haltern

München
Mai 1984

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Bohn

2. Berichterstatter : Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung : 23. 10. 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bohn durchgeführt.
Sie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Projekt Bo 453/11-2).

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Horst Bohn für seine ständige Hilfsbereitschaft und für seine wertvollen Ratschläge.
Eine große Hilfe waren mir die Beratung und Unterstützung meiner Arbeit durch Kollegen aus der Abteilung von Prof. Dr. B. Linzen, insbesondere durch Dr. Jürgen Markl, Dr. Walter Schartau, Dr. Manolis Stratakis, Herrn Heinz Decker und Herrn Walter Stöcker.
Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen und Kolleginnen unserer Abteilung, insbesondere bei Frau Terry Saks, die stets für ein gutes Arbeitsklima im Labor sorgte.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN 5

1. Chemikalien 5
2. Pufferspezies, Lösungen und Färbungen 7
3. Fachausdrücke und Abkürzungen 8
4. Tiere und Tierhaltung 8
5. Präparation von Haemocyten, Plasma, Serum, Haemocyten-Gel und Haemolymph-Clot 9
6. Herstellung der Antigene für die immunologischen Untersuchungen (a) und die Immunisierung (b) 10
   a. Antigene für die immunologischen Untersuchungen 10
   b. Antigene für die Immunisierung 13
7. Verwendete Immunseren 14
8. In-vitro-Testsystem 15
   a. Experimente E 1-3 zur Prüfung der Gerinnung auf Vollständigkeit 15
   b. Kombination von Haemocyten-Gel und Plasma 16
   c. Isolierung von PC durch Dissoziation 16
   d. Kombination von Haemocyten und Plasma 17
9. Isolierung von PC durch Präzipitation 17
10. Elektrophoresen 18
    a. Eindimensionale Immunelektrophorese 18
    b. Zweidimensionale Immunelektrophorese 18
    c. Quantitative Radialimmundiffusion 19
    d. Analytische Plattengelelektrophorese (PAGE) 19
    e. Kombination von PAGE und Immundiffusion 19
    f. Analytische SDS-PAGE 20
    g. Anfärbung und Auswertung der Gele 20
11. Säulengelchromatographie 21
12. Dünnschichtgelchromatographie (DGC) 21
13. Ionenaustauschchromatographie 22
14. Analytische Ultrazentrifugation 22

a. Sedimentationskoeffizient 22
b. Sedimentationsgleichgewichts-Lauf 23
15. Aminosäureanalyse 23
16. Proteinbestimmungen 24
17. Kohlenhydratbestimmung 24
18. Lipidextraktion und Lipidbestimmung 24
C. E R G E B N I S S E 26
1. Nachweis für die Beteiligung zweier unterschiedlicher Gerinnungsproteine an der Gerinnselbildung 26
a. Immunologische Untersuchungen des Haemocyten-Gel und des Haemolymph-Clot
Nachweis des Haemocyten-Coagulogen (HC) 26
b. Vergleich von Plasma und Serum in der Immunelektrophorese
Nachweis des Plasma-Coagulogen (PC) 29
c. Vergleich von Plasma und Serum in der PAGE
Kombination von PAGE und Immundiffusion
zur Identifizierung des PC-Präzipitats 30
2. In-vitro-Testsystem mit Haemocyten-Gel und Haemolymph-Plasma 33
3. Isolierung von Plasma-Coagulogen durch Dissoziation 39
a. Assoziation und Dissoziation von Haemocyten-Gel und PC 39
b. Reinigung von PC durch Säulengelchromatographie 41
c. Homogenitätsnachweis von gereinigtem PC in Immunelektrophorese, PAGE und durch Sedimentationsläufe 42
4. Isolierung von Plasma-Coagulogen durch Präzipitation 42
a. Ausfällen mit Wasser 45
b. Isolierung durch Dialyse gegen niedermolare Tris-HCl-Lösung 45
c. Reinigung von PC in der Ionenaustausch-

chromatographie 46
d. Homogenitätsnachweis von gereinigtem PC in Immunelektrophorese und PAGE 46
5. Nachweis für die Reaktionsfähigkeit von isoliertem PC 48
6. Molekulargewichtsbestimmungen des nativen PC 50
a. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der PAGE 52
b. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelchromatographie 52
c. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge 55
7. Dissoziation des PC in seine Untereinheiten 57
8. Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptidketten in der SDS-PAGE 59
9. Die Lipid- und Kohlenhydratbestandteile des PC 61
10. Mengenmäßiger Anteil des PC am Gesamtplasma 64
11. Aminosäureanalyse von PC 66
D. D I S K U S S I O N 68
1. Blutgerinnung bei Leucophaea maderae 68
a. Haemocyten-Gelierung (Gel) 68
b. Haemolymph-Gerinnung (Clot) 69
c. Ablauf der nativen Gerinnung 70
2. Vergleich der Gerinnungsmechanismen innerhalb der Arthropoden 74
a. Gerinnung bei den Crustaceen 74
b. Gerinnung bei den Xyphosuren 76
c. Gerinnung bei den Insekten 77
3. Charakterisierung des Plasma-Coagulogens (PC) von Leucophaea maderae 79
a. Isolierungsmethoden für PC 80
b. Reaktionsfähigkeit von PC 81
c. Molekulargewichtsbestimmungen von PC 81
d. Der Aufbau von PC aus Untereinheiten 83
e. Chemischer Aufbau des PC 83

4. Vergleich von PC mit anderen Gerinnungsproteinen 84
5. Vergleich von PC mit Lipophorinen 85
6. Diskussion der physiologischen Funktionen von PC 89
E. Z U S A M M E N F A S S U N G 91
F. L I T E R A T U R 94

A. Einleitung

Blutgerinnung spielt sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten eine große Rolle. Insbesondere bei Insekten, die nicht durch Muskelkontraktion einen schnellen Wundverschluß herbeiführen können, ist ein funktionierendes Blutgerinnungssystem von lebenswichtiger Bedeutung.
Die Frage nach Ähnlichkeiten zwischen Blutgerinnungssystemen verschiedener Tierstämme oder nach dem ursprünglichen System läßt sich nur durch gründliche Untersuchungen auf diesem Gebiet klären.
Während die Blutgerinnung bei den Säugetieren eingehend untersucht und weitgehend aufgeklärt ist, bestehen bei den Arthropoden, insbesondere bei den Crustaceen, noch Unklarheiten. Bei den Insekten ist der Chemismus der Blutgerinnung bisher sogar weitgehend unbekannt.
Im Laufe der letzten Jahre gelang es bei einigen Vertretern der Crustaceen (Bauchau and Mengeot, 1978; Doolittle and Fuller, 1972; Durliat and Vranckx, 1976; 1981; Fuller and Doolittle, 1971; Lorand, 1972; Stewart et al., 1966) und bei Limulus polyphemus und Verwandten, den Xiphosuren, (Dumont et al., 1966; Gaffin, 1976; Levin and Bang, 1968; Liu et al., 1979; Nakamura et al., 1982; Solum, 1973; Young et al., 1972) Gerinnungsfaktoren zu analysieren und zu charakterisieren. Nach den bisher vorliegenden Analysen bestehen grundlegende Unterschiede, die Herkunft der Gerinnungsproteine betreffend, zwischen den Xiphosuren, den ursprünglichsten Vertretern der Arthropoden, und den Crustaceen. Beiden gemeinsam jedoch ist, daß das Blutgerinnsel nur aus einem einzigen Protein besteht, was im übrigen auch auf die Vertebraten zutrifft. Bei den Xiphosuren stammt das Gerinnungsprotein aus den Granula der Haemocyten. Es polymerisiert, nachdem ein Teilstück durch ein enzymatisches System abgespalten worden ist. Bei den Crustaceen wird ein gelöstes Plasma-Protein, das dem Vertebraten-Fibrinogen entspricht, durch ein aus den Haemocyten

stammendes Enzym kovalent verknüpft. Nach bisher vorliegenden Untersuchungen der Blutgerinnung bei Insekten, wie bei Periplaneta americana (Siakotos, 1960), bei Schistocerca gregaria (Bowen and Kilby, 1953) und bei Locusta migatoria (Brehélin, 1972; 1979; Gellissen, 1983), kann man auch hier, wie bei den Crustaceen, auf die Beteiligung eines Gerinnungsproteins aus dem Plasma an der Blutgerinnung schließen.

Untersuchungen der Blutgerinnung bei der Schabe Leucophaea maderae in unserer Arbeitsgruppe gaben jedoch starke Hinweise auf eine Beteiligung zweier unterschiedlicher Proteine an der Bildung des Gerinnsels. Die vollständig vom Plasma getrennten Haemocyten bildeten bei entsprechender Behandlung (Ultraschall oder Einfrieren-Auftauen) ein Gel. Diese Erscheinung ließ uns zunächst vermuten, daß bei Leucophaea, ähnlich wie bei Limulus, ein Haemocyten-Coagulogen an der Bildung des nativen Gerinnsels beteiligt sei. Diese Annahme widersprach aber den mikroskopischen Untersuchungen über den Ablauf der Gerinnung bei Insekten von Grégoire (1974) und Grégoire und Goffinet (1979), die besagten, daß die Gerinnungsinseln aus Plasma-Protein bestehen. Siakotos (1960) zeigte für Periplaneta ebenfalls, daß eine Plasma-Lipoprotein-Fraktion während der Gerinnung verschwindet.

Wir stellten zudem fest, daß sich das native Gerinnsel (Clot), welches in Anwesenheit sämtlicher Haemolymphbestandteile entsteht, in vielen Eigenschaften vom Haemocyten-Gel unterscheidet. Das Gel ist weich und locker und besitzt eine mehrfach größere Quellkapazität als das festere und widerstandsfähigere Clot. Haemolymph-Clot ist im Gegensatz zum Haemocyten-Gel nicht löslich in reduzierenden Agentien, auch wenn diese in konzentrierter Harnstoff-Lösung vorliegen. Dieses Verhalten deutet auf eine kovalente Verknüpfung von Proteinen im Clot hin. Die unterschiedlichen Eigenschaften von Gel und Clot legten die Vermutung nahe, daß im Haemolymph-Gerinnsel, zusätzlich zu den im Haemocyten-Gel vorhandenen Bestandteilen, Material aus der Haemolymphe enthalten ist.

Eine der Aufgaben war es nun, die verschiedenen Bestandteile des Haemolymph-Gerinnsels und die Art ihrer Interaktion zu identifizieren.

Aufbauend auf meiner Zulassungsarbeit versuchte ich im Rahmen dieser Doktorarbeit, die Frage nach dem Aufbau des nativen Haemolymph-Gerinnsels zu klären. Die Untersuchungen brachten die überraschende Erkenntnis, daß bei Leucophaea, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Arthropodenvertretern, die Gerinnungssubstanz aus zwei verschiedenen Proteinen besteht, wobei das eine aus den Haemocyten stammt, Haemocyten-Coagulogen (HC), das andere aus dem Plasma, Plasma-Coagulogen (PC) (siehe auch Barwig and Bohn, 1980). Diese beiden Coagulogene scheinen bei der Bildung des nativen Gerinnsels zu interagieren. Im Verlauf unserer Arbeit wurde ein Testsystem entwickelt zur Untersuchung der Art der Interaktion dieser beiden Gerinnungsproteine. Hierbei wurde unter anderem ein Assoziat aus beiden Gerinnungsproteinen hergestellt, in dem das PC spezifisch aus allen anderen Haemolymph-Proteinen vom Haemocyten-Coagulogen gebunden wurde. Unter bestimmten Bedingungen konnte dieses PC wieder aus der Bindung mit dem Gel gelöst werden. Auf diese Weise erhielt man PC, das nahezu frei von Verunreinigungen war. Hieraus ließ sich eine relativ einfache Isolationsmethode für dieses Protein entwickeln.

Eine weitere Aufgabe, die sich stellte, bestand darin, das PC in homogener Form in präparativem Maßstab zu gewinnen, um es zum einen anstelle des Gesamtplasmas in unser Testsystem einzusetzen. Zum anderen sollte dieses Protein möglichst genau chemisch charakterisiert werden, um es mit schon bekannten Gerinnungsproteinen anderer Arthropodenvertreter vergleichen zu können. Dabei gelang es, PC mit Hilfe einer weiteren Isolationsmethode zu gewinnen. Das Molekulargewicht des nativen Moleküls und seiner Untereinheiten wurde bestimmt und die chemische Zusammensetzung des Proteins so weit wie möglich analysiert. Da bei Insekten wenig detaillierte Informationen über Blutgerinungsproteine vorhanden sind, wurde außerdem ein Vergleich mit ähnlich aufgebauten Plas-

ma-Proteinen von Insekten durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß das PC von Leucophaea erstaunliche Übereinstimmung im Aufbau mit den Lipophorinen, einer bestimmten Klasse von Insekten-Lipid-Transportproteinen, zeigt.

B. Material und Methoden

1. Chemikalien

Alle Reagentien waren von p.A. Qualität. Sie wurden von MERCK bezogen, mit Ausnahme von:

Agarose VI	SIGMA, München
Dithiothreitol (DTT)	
Urease (jack beans)	
Conalbumin	
Glycine amide	
N-Ethylmaleimide	
Phosphomolybdänsäure	
Molybdän Blau	
Ninhydrin	

SDS 6H (High Molecular Weight Standard Mixture):
Myosin, ß-Galaktosidase, Phosphorylase B, Albumin (bovine), Albumin (egg), Carbonic Anhydrase

Referenzlipide:
Phosphatidyl Inositol
Phosphatidyl L Serine
Phosphatidylethanolamine
Phophatidylcholine
Diolein (85%, 1,3)
Triolein
Cholesterol Oleate
Cholesterol Palmitate

Ethylendiamintetraessigsäure-Na_2-Salz (EDTA)	SERVA, Heidelberg
Sudan Schwarz 10 B	
Coomassie Brilliant Blue R 250	
Serva Blau G (R)	
Acrylamid	
N,N'-Methylenbisacrylamid	
N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-diamin (TEMED)	
Rinderserumalbumin	
Lactatdehydrogenase	
Stickstoff	LINDE, München
Kohlenstoff	
Ultrogel AcA 22	LKB-PRODUKTER, Bromma/Schweden
FAC = Freund's Adjuvant Complete	DIFCO, Detroit/USA
Sephadex G 200 Superfine	PHARMACIA, Uppsala/ Schweden
DEAE Sephacel	
Gel filtration calibration kit:	
Aldolase, Catalase, Ferritin,	
Thyroglobulin	
Polyacrylamide Gradient Gels	
PAA 4/30 und PAA 2/16	
LabTrol E	MERZ & DADE, München

2. Pufferspezies, Lösungen und Färbungen

(soweit nicht an entspechender Stelle näher beschrieben)

EDTA-Medium	=	Medium nach Landureau and Grellet (1972),ohne fötales Kälberserum, mit Zusatz von 5% EDTA zur Verhinderung der Desintegration der Haemocyten
Tris-HCl	=	Tris-HCl Puffer, pH=7,2 (Molarität ist jeweils angegeben)
Veronal Puffer	=	0,0265 M 5,5 Diethylbarbitursäure-Na Salz, 0,04 M Na-Acetat x3 H_2O, mit 0,04% NaN_3, pH=8,6, μ=0,05
Detergens-Lösung	=	2 M Harnstoff, 2% SDS, 0,85% NaCl
DTT-Lösung	=	0,5 M Dithiothreitol, 8 M Harnstoff in 0,05 M Tris-HCL
1%ige Agarose-Lösung	=	1% Agarose VI wird in Veronal Puffer/dest.Wasser (1:1,v/v) zum Sieden erhitzt und filtriert
Amido Schwarz Färbung	=	nach Schwick und Störiko (1964)
Sudan Schwarz Färbung	=	nach Uriel (1964) für Immunelektrophorese
	=	nach Prat et al. (1969) für PAGE
Serva Blau G Färbung	=	2,5g Serva Blau G in 200 ml Methanol, 50 ml Essigsäure ad 500 ml H_2O etwa 10 min in der Farblösung färben, entfärben mit entsprechender Lösung ohne Farbstoff
Coomassie Brilliant Blue R 250 Färbung	=	0,2% Coomassie Brilliant Blue in 50% Methanol, 10% Essigsäure - 1 h in der Farblösung färben, entfärben mit: 30% Methanol, 10% Essigsäure

3. Fachausdrücke und Abkürzungen

Für Leucophaea maderae wurden folgende Bezeichnungen und Abkürzungen verwendet:

Haemolymphe	= Flüssigkeit, die das Haemocoel ausfüllt
Haemocyten	= Blutkörperchen der Insekten
Serum	= Überstand der geronnenen Haemolymphe
Plasma	= Haemolymphe ohne Haemocyten
Clot	= Haemolymph-Clot = natives Haemolymph-Gerinnsel
Gel	= Haemocyten-Gel = Haemocyten-Gerinnsel = Gerinnungsprodukt beim Platzen von Haemocyten in Abwesenheit von Plasma-Proteinen
HC	= Haemocyten-Coagulogen = Haemocyten-Gerinnungsprotein
PC	= Plasma-Coagulogen = Plasma-Gerinnungsprotein

4. Tiere und Tierhaltung

Die afrikanische Schabe Leucophaea maderae (Fabr.), unser Versuchstier, wurde in großen Plastikwannen bei 27° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 50% nach Stadien getrennt gehalten. Adulte, kleine, mittelgroße und große Larvenstadien befanden sich in verschiedenen Plastikwannen. Sie wurden mit dem Rattenfutter ALTROMIN R 1321 der Firma Altrogge und täglich mit frischen Äpfeln und destilliertem Wasser gefüttert. Für die Versuche wurden nur Tiere des letzten Larvenstadiums beider Geschlechter genommen.

5. Präparation von Haemocyten, Plasma, Serum, Haemocyten-Gel und Haemolymph-Clot

Alle folgenden Arbeiten wurden bei 5° C in der Kühlkammer durchgeführt. Für einen Versuchsansatz wurden in der Regel 120 Tiere 2 - 3 Stunden bei 5° C gekühlt, bis sie fast bewegungslos waren. Dann wurde jedem Tier 0,4 ml eisgekühltes EDTA-Medium injiziert, um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Die Tiere wurden nach Amputation eines Beines entblutet, wobei die durchschnittliche Ausbeute pro Tier 8 Tropfen Blut betrug. Das Blut von je 30 Tieren wurde in eisgekühlten silikonisierten Zentrifugengläsern, gefüllt mit 12,5 ml EDTA-Medium , aufgefangen. Die Haemocyten wurden 10 min bei 45 x g abzentrifugiert.

Der Überstand, das Plasma, wurde nochmals zentrifugiert (10 min bei 15 000 x g), um alle Haemocyten-Partikel zu entfernen. Durch anschließende zweitägige Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl wurde das störende EDTA aus der Proteinlösung entfernt. Da die durch Puffer verdünnte Plasma-Lösung nur eine geringe Proteinkonzentration hatte (etwa 6 mg/ml), wurde sie für die Versuche mit Hilfe der Membran-Ultrafiltration (Millipore, Bedford/USA) bei 5-7 atm N_2 konzentriert, zentrifugiert und die Proteinkonzentration auf den gewünschten Wert eingestellt. Aufbewahrt wurde die konzentrierte Plasma-Lösung bei -20°C.

Die vom Plasma abzentrifugierten Haemocyten wurden einmal in Medium mit und zweimal in Medium ohne EDTA gewaschen (Suspendieren der Zellen von je 30 Tieren in je 3 ml Medium - 4 min Zentrifugieren bei 45 x g) und zum Schluß in 1,5 ml Medium suspendiert. Diese intakten Haemocyten wurden entweder direkt für Gerinnungsexperimente benutzt oder zu Haemocyten-Gel weiterverarbeitet. Dabei wurde die Gerinnung der Haemocyten zum einen ausgelöst durch zweimaliges Einfrieren in Trockeneis (5 min) und Auftauen im Wasserbad (45 min bei Raumtemperatur), zum anderen durch kurze Behandlung der Haemocyten mit Ultraschall. Dabei wurden 0,5 ml Haemocyten-Suspension für 10 sec bei # 2 mit dem

Mikrotip eines Bronson Sonicators behandelt. Das Haemocyten-Gel wurde entweder sofort weiterverwendet oder ebenfalls bei - 20°C aufbewahrt.

Um Haemolymph-Clot zu gewinnen, wurden die gekühlten Tiere, in der Regel 100-200 Schaben, ohne vorhergehende Injektion entblutet, mit einer Ausbeute von etwa 4 Tropfen Blut pro Tier. Die Haemolymphe wurde sofort eingefroren, indem sie in einem mit Trockeneis gekühlten Becherglas aufgefangen wurde. Durch Auftauen im Wasserbad (45 min bei Raumtemperatur), erneutes Einfrieren in Trockeneis (5 min) und Auftauen im Wasserbad wurde die Gerinnung vervollständigt.

Das Serum erhielt man durch Abzentrifugieren (45 min bei 5°C und 20 000 x g) des Haemolymph-Clot nach dem zweiten Auftauvorgang als Überstand. Clot und Serum wurden ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

6. Herstellung der Antigene für die immunologischen Untersuchungen (a) und die Immunisierung (b).

Zur Verdeutlichung der Antigenpräparation wurde ein Schema (siehe Abb.1) angefertigt.

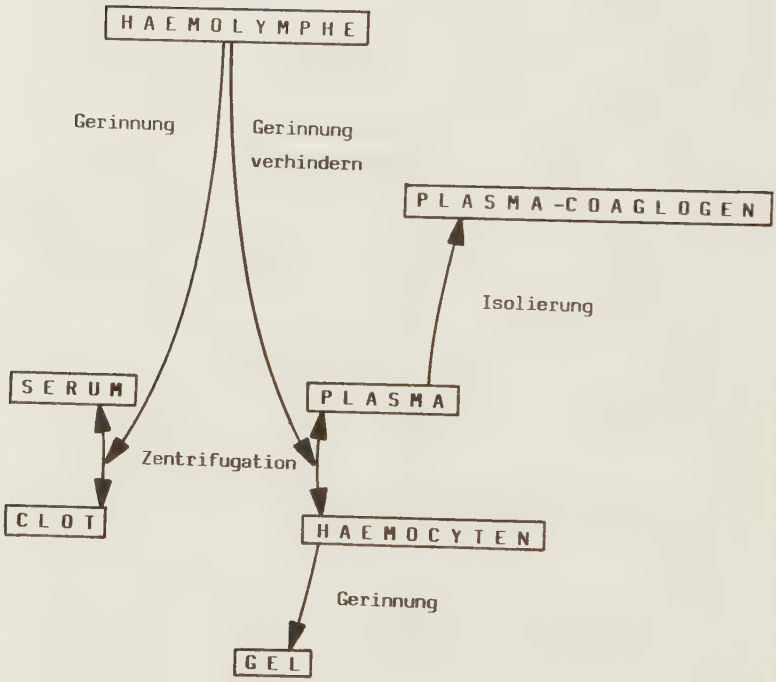
a. Antigene für die immunologischen Untersuchungen

Haemolymphe	:	gefroren, lyophylisiert und kurz vor ihrer Verwendung in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst
Haemocyten	:	dreimal 30 sec mit Ultraschall behandelt
Serum	:	ohne zusätzliche Behandlung verwendet
Plasma	:	mit Hilfe von Ultrafiltration auf den gewünschten Wert konzentriert
Plasma-Coagulogen	:	PC aus beiden Isolationsverfahren mit Hilfe von Ultrafiltration auf den gewünschten Wert konzentriert

Haemocyten-Gel, mit Detergentien gewaschen : Haemocyten-Gel wurde durch Zentrifugation (45 min, 20 000 x g, 15°C) von löslichen Bestandteilen getrennt. Durch folgende Waschprozedur wurden alle noch vorhandenen Zellreste entfernt: Das Pellet wurde mit einer feinen Schere zerkleinert, das 7,5-fache des ermittelten Gewichts an physiologischer NaCl-Lösung zugegeben, vermischt und dann zentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 15°C). Das Gerinnsel wurde dann mit der 7-fachen Menge an Detergens-Lösung versetzt und 17 h bei 10°C auf einem Magnetrührer gerührt. Nach Zentrifugation wurde der Waschvorgang noch zweimal mit Detergens-Lösung, dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung und zweimal mit dest. Wasser wiederholt. Der Waschvorgang umfaßte jeweils 30 min Rühren bei 10°C, 15 min Zentrifugieren bei 20 000 x g und 15°C. Das erhaltene Pellet wurde bei -20°C eingefroren. Kurz vor der Weiterbehandlung wurde es aufgetaut, durch zweimalige 30 sec Ultraschall-Behandlung in Lösung gebracht und von nicht gelösten Bestandteilen getrennt.

Haemolymph-Clot mit Detergentien gewaschen : wurde einer dem Haemocyten-Gel entsprechenden Behandlung unterzogen.

Abb.1 Schema der Antigenpräparation



b. Antigene für die Immunisierung

Für die Immunisierung der Kaninchen wurden folgende Antigene verwendet:

Haemocyten-Gel und Haemolymph-Clot, beide mit Detergentien gewaschen, Haemolymphe und Haemocyten.

Die in Lösung gebrachten Antigene (wie unter Punkt a beschrieben) wurden mit Adjuvantien gemischt und Kaninchen in wöchentlichem Rhythmus eingespritzt.

Die erste Injektion wurde jeweils intravenös vorgenommen, wobei $Al(OH)_3$ im Immunisierungsgemisch enthalten war. Die folgenden Injektionen wurden subcutan vorgenommen. Hierfür wurden die gelösten Antigene mit Freund's Adjuvant Complete mit Hilfe von Ultraschall emulgiert.

Die Immunisierung wurde dann beendet, wenn der Antikörpergehalt zweier hintereinander entnommener Blutproben keinen Unterschied mehr in der Konzentration zeigte. In der Regel dauerte eine Immunisierung drei bis vier Monate.

7. Verwendete Immunseren

Die verschiedenen Antiseren sind der Übersicht halber in folgender Tabelle (Tab.1a,b) aufgelistet:

Tab. 1

Auflistung der verwendeten Seren

a. verwendete Antiseren

Nr. des Antiserum	Antigen für die Immunisierung	mit Antikörpern gegen
A 1	Haemocyten-Gel (Det. gew.)	Haemocyten-Coagulogen
A 2	Haemolymph-Clot (Det. gew.)	Haemocyten-Coagulogen u. Plasma-Coagulogen
A 3	Haemolymphe	alle Haemolymphbestandteile
A 4	Haemocyten	Haemocyten-Coagulogen (unter anderem)

b. verwendete absorbierte Antiseren

Nr. des absorb. Antiserums	folgendes Antiserum wurde absorbiert	absorbiert mit	spezifisch gegen
A 2a	A 2	Serum u. Haemocyten	Plasma-Coagulogen
A 3a	A 3	Serum u. Haemocyten	Plasma-Coagulogen
A 3b	A 3	Haemocyten	Plasma-Proteine

8. In-vitro-Testsystem

a. Experimente E 1-3 zur Prüfung der Gerinnung auf Vollständigkeit

Es wurde versucht, die Gerinnung teilweise durch ein in-vitro-Testsystem zu simulieren. Dazu wurden verschiedene Haemocyten-Präparationen mit Plasma kombiniert. Nach der Reaktion wurde der Erfolg der Gerinnung mit Hilfe folgender Experimente geprüft:

E 1 : Der Verbrauch von PC aus dem Plasma (durch die Interaktion) wurde durch quantitative Bestimmung des PC (radiale Immundiffusion, siehe Punkt 10c) im Überstand nach Zentrifugation bestimmt.

E 2 : Die Löslichkeit des Gerinnungsproduktes in reduzierenden Reagentien wurde getestet. Dazu wurde das entstehende Gerinnsel 20 h bei 37°C mit dem 10-fachen Volumen DTT-Lösung behandelt. Nach Zentrifugation wurde das Verhältnis Anfangs- zu End-Volumen des Gerinnsels bestimmt, das ein Maß für die Vollständigkeit der Gerinnung darstellt. Ein Anstieg des Volumens um den Faktor 1,5 und mehr, bedingt durch die schwellende Wirkung des Harnstoffs in der DTT-Lösung auf das Gerinnsel, deutete auf eine vollständige Gerinnung hin. Ein als Kontrolle eingesetztes Haemocyten-Gel löste sich in der DTT-Lösung weitgehend auf, was eine Volumen-Abnahme um den Faktor 0,6 und weniger ergab.

E 3 : Bei unvollständiger Gerinnung ließ sich ein Großteil des PC aus dem Gerinnungsprodukt wieder herauslösen. Dazu wurde das zweimal in 0,05 M Tris-HCl gewaschene Gerinnsel mit einer Lösung von 0,4 M EDTA in 0,05 M Tris-HCl im Verhältnis 1:1 versetzt, so daß die Endkonzentration von EDTA 0,2 M betrug. Nach 30 min Rühren bei 5°C wurde nach Zentrifugation der Überstand auf den Gehalt an PC hin analysiert (siehe quantitative Radialimmundiffusion, Punkt 10c).

b. Kombination von Haemocyten-Gel und Plasma

Das eingefrorene Haemocyten-Gel wurde 45 min im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut, zentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 5°C) und gewogen. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gels mit einer Schere wurde mit 10 x Vol. 0,1 M Tris-HCl gewaschen (30 min Rühren bei 5°C auf einem Magnetrührer) und zentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 5°C), um lösliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Waschvorgang wurde mit 0,05 M Tris-HCl wiederholt. Ein Teil des gewaschenen Haemocyten-Gels, in der Regel 0,1 mg, wurde mit einem Teil Plasma mit 30 mg/ml Proteinkonzentration in 0,05 M Tris-HCl gemischt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Beim Testen verschiedener Agentien, wie zum Beispiel von $CaCl_2$, EDTA oder von Hemmstoffen, wurden 0,05 ml Plasma mit einer Proteinkonzentration von 60 mg/ml zunächst 1:1 mit der zu untersuchenden Lösung gemischt und dann erst zu dem Haemocyten-Gel gegeben. Nach einer bestimmten Reaktionszeit bei Raumtemperatur (in der Regel 30 oder 60 min) wurde das Gemisch zentrifugiert (45 min, 20 000 x g, 5°C). Der Überstand wurde in der quantitativen Radialimmundiffusion auf seinen Gehalt an PC hin untersucht (siehe Punkt 10c). Das Pellet, ein Assoziat aus HC und PC, wurde dreimal mit 10 x Vol. 0,05 M Tris-HCl gewaschen, um alle nicht assoziierten Proteine zu entfernen. Dieses gewaschene Assoziat wurde in einigen Tests zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen Lösungen behandelt. Die Auswertung erfolgte durch quantitative Radialimmundiffusion (Punkt 10c) und mit dem unter E 2 beschriebenen Experiment. Mit Hilfe dieser Methode in leicht abgewandelter Form wurde auch PC isoliert.

c. Isolierung von PC durch Dissoziation

Unter folgenden Reaktionsbedingungen wurde PC gewonnen:

Haemocyten-Gel von 120 Tieren, was etwa 1,5 g Gel entsprach, wurde, wie schon beschrieben, gewaschen. Dieses gewaschene Gel wurde mit Plasma, das gegen 0,05 M Tris-HCl dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 33 mg/ml eingestellt worden war, im

Volumenverhältnis Gel:Plasma (1:10) gemischt. Nach einer Stunde Reaktion bei Raumtemperatur, das heißt Rühren auf einem Magnetrührer, wurde durch Zentrifugation (15 min, 20 000 x g, 5°C) das HC-PC-Assoziat von nicht reagierten Haemolymph-Proteinen befreit. Dreimaliges Nachwaschen mit dem 10-fachen Volumen 0,05 M Tris-HCl sollte gewährleisten, daß möglichst reines HC-PC-Assoziat vorlag. Um PC aus dem Komplex wieder herauszulösen, wurden 10 Teile 0,2 M Tris-HCl zu dem gewaschenen Pellet gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Rühren auf dem Magnetrührer wurde zentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 5°C). Im Überstand befanden sich das dissoziierte PC und in einigen Fällen zu einem geringen Anteil andere Haemolymph-Proteine. Diese wurden mit Hilfe der Gelfiltration abgetrennt (siehe Punkt 11).

d. Kombination von Haemocyten und Plasma

Hierfür wurden intakte Haemocyten, in Medium suspendiert, mit Plasma (etwa 100 mg/ml Proteinkonzentration) in 0,05 M Tris-HCl + 5m M $CaCl_2$ im Volumenverhälnis 1:2 gemischt. Die Gerinnung wurde induziert durch zweimaliges Einfrieren in Trockeneis (5 min) und Auftauen bei Raumtemperatur im Wasserbad (45 min). Nach Zentrifugation (45 min, 20 000 x g, 5°C) wurde der Erfolg der Gerinnung mit den oben schon beschriebenen Experimenten E1 - E3 geprüft.

9. Isolierung von PC durch Präzipitation

30 ml Plasma-Lösung mit etwa 30 mg/ml Proteinkonzentration wurde 24 h gegen 0,001 M Tris-HCl-Lösung, pH=5 oder 6 dialysiert. Es bildete sich ein Präzipitat, das zum größten Teil aus PC bestand, außerdem aber noch einen geringen Anteil an mitausgefällten Haemolymph-Proteinen enthielt. Dieses Präzipitat wurde abzentrifugiert (15 min, 17 000 x g, 5°C) und dreimal mit 3 ml Dialyse-Lösung gewaschen (5 min stark Rühren, 15 min bei 17 000 x g und 5°C Zentrifugieren). Das gewaschene Präzipitat wurde in 5 ml

0.05 M Tris-HCl gelöst (60 min Rühren bei 5°C), wobei sich allerdings ein Teil des Präzipitates nicht auflöste. Um das PC von den mitausgefällten Proteinen zu trennen, wurde die Proteinlösung auf eine Ionenaustauschsäule (wie unter Punkt 13 beschrieben) gegeben.

10. Elektophoresen

a. Eindimensionale Immunelektrophorese

Die eindimensionale Immunelektrophorese wurde nach Schwick und Störiko (1964), basierend auf der klassischen Immunelektrophorese von Grabar und Williams (1953), durchgeführt.
Mikroskop-Objektträger (2,4 x 7,2 cm) wurden mit 3 ml 1%iger Agarose beschichtet. In ausgestanzte Löcher wurden 5 µl, in einigen Fällen auch 10 µl Antigen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde in einer Shandon Elektrophoresekammer in Veronal Puffer bei 5°C durchgeführt. Die Antigene wurden durch Anlegen eines Stromes von 5m A pro Objektträger aufgetrennt. Mit Hilfe eines Bromphenolblau-Markers, der parallel lief, konnte die Elektrophorese nach Erreichen der gewünschten Strecke (in der Regel 2 cm) beendet werden. Das Antiserum (100 µl) wurde in eine Rinne parallel zur Laufrichtung der Antigene eingebracht. Es schlossen sich zwei Tage Diffusion in einer feuchten Kammer bei 5°C an.

b. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese wurde nach Weeke (1973) auf 5 x 5 cm großen Diagläsern, beschichtet mit je 4 ml 1%iger Agarose , durchgeführt. In der 1. Dimension wurde das Antigen mit 6 mA Strom pro Diaglas und einer Laufzeit von 2 Stunden bei 5°C aufgetrennt. In der 2. Dimension wurde ein 10% Antiserum enthaltendes Agarosegel angegossen und über Nacht (etwa 17-18 h) ein Strom von 1m A pro Diaglas angelegt. Agarosegel, Puffer und Elektrophoresekammer wurden, wie bei der eindimensionalen Immunelektrophorese beschrieben, verwendet.

c. Quantitative Radialimmundiffusion

Mikroskop-Objektträger wurden mit 3 ml Agarosegel, welches 1-2% monospezifisches Antiserum gegen PC enthielt, beschichtet. In Löcher von 2 mm Durchmesser wurden 5 µl Antigen-Lösung gefüllt. Nach 2 Tagen Diffusion in einer feuchten Kammer bei 5°C bildeten sich kreisförmige Präzipitate, deren Durchmesser bestimmt wurde. Anhand von Eichkurven, die aus Verdünnungen des Antigens hergestellt wurden, ließ sich der relative Gehalt an PC in der Antigen-Lösung bestimmen (Schwick und Störiko, 1964). Der relative Gehalt an PC wird in der Regel in Units (100 Units PC entsprechen etwa 68 mg/ml Proteinkonzentration vom Plasma) angegeben. In einigen früheren Versuchen wurde nur der relative PC-Gehalt in % angegeben.

d. Analytische Plattengelelektrophorese (PAGE)

Es wurden in den meisten Fällen Plattengele mit 5-10% Polyacrylamidkonzentration, die mit einem 3%igen Sammelgel (pH=6,8) versehen waren, zum Teil auch Fertiggele von Pharmacia/Schweden, verwendet. Das Puffersystem von Laemmli (1970) mit 0,025 M Tris-HCl, 0,6 M Glycine Puffer, pH=8,2, kam zur Anwendung. Die Elektrophoresen wurden in einer Apparatur der Firma Pharmacia/Schweden bei 125 Volt mit einer Laufzeit von 2-3 Stunden durchgeführt.
Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Eichproteine verwendet: Rinderserumalbumin (68 000), Catalase (230 000), Ferritin (440 000) und Thyroglobulin (660 000).

e. Kombination von PAGE und Immundiffusion

Zunächst wurden mehrere Plasma-Proben parallel in der PAGE aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel in Streifen geschnitten. Ein Streifen wurde wie üblich angefärbt. Ein Streifen wurde auf einen mit 1%iger Agarose-Lösung beschichteten Objektträger gelegt, parallel zu einer ausgestanzten Rille, die mit 100 µl Antiserum gefüllt war. Nach 5 Tagen Diffusion in der feuchten Kammer bildeten sich an der Stelle Präzipitatbögen, wo entsprechende Antigene

aus dem Polyacrylamidgel und Antikörper aus dem Agarosegel zusammentrafen.

f. Analytische SDS-PAGE

Es wurde wie bei der PAGE (Punkt d) vorgegangen, mit dem Unterschied, daß dem Trenngel, dem Sammelgel und dem Elektrodenpuffer 0,2% SDS hinzugefügt wurden. Die Proteine wurden vor dem Auftragen aufs Gel mit Hilfe von SDS in folgender Weise denaturiert:
Die Proteinlösungen, die 2% SDS enthielten, wurden 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert.
Das Molekulargewicht der Untereinheiten wurde nach Weber und Osborn (1969) bestimmt. Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung dienten: Albumin (egg) (45 000), Rinderserumalbumin (68 000), Phosphorylase B (98 000), ß Galaktosidase (116 000), Myosin (200 000) und Thyroglobulin (330 000).

g. Anfärbung und Auswertung der Gele

Die eindimensionale Immunelektrophorese war nach ein bis zwei Tagen Diffusion bei 5°C in der feuchten Kammer beendet. Die Präzipitate auf den Objektträgern wurden gezeichnet und photographiert. Danach wurden nicht präzipitierte Proteine drei Tage lang in physiologischer Kochsalz-Lösung ausgewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden mit Amido Schwarz 10 B (nach Schwick und Störiko, 1964) und in einigen Fällen mit Sudan Schwarz B (nach Uriel, 1964) gefärbt und, falls erforderlich, noch einmal photographiert.
Die Präzipitate in der zweidimensionalen Immunelektrophorese wurden direkt nach Beendigung der Elektrophorese gezeichnet, photographiert und mit Serva Blau G gefärbt.
Die Banden der PAGE und SDS-PAGE wurden mit Coomassie Brilliant Blue R 250 und mit Sudan Schwarz 10 (Prat et al., 1969) gefärbt. Die Gele wurden photographiert und getrocknet.
In einigen Fällen wurden SDS-PAGE Gele mit Hilfe eines Joyce-Loeble Microdensitometers (3C5) bei 550 nm aufgezeichnet.

11. Säulengelchromatographie

PC- Präparationen, die mit Hilfe des Assoziation-Dissoziations-Verfahrens gewonnen wurden und noch Verunreinigungen von Haemolymph-Proteinen enthielten, wurden auf eine Ultrogel AcA 22 Säule der Firma LKB/Schweden von 86 cm Länge und 1,6 cm Durchmesser gegeben.In der Regel wurden 1-2 ml Proteinlösung mit etwa 2 mg/ml Proteinkonzentration aufgetragen. Die Säule war mit 0,05 M oder mit 0,1 M Tris-HCl Puffer, pH=7,4, unter Zusatz von 0,17 M NaCl und 0,02% NaN_3, äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 3,75 ml/h. 2 ml PC-Fraktionen, die im ersten Peak auftraten, wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration konzentriert und in der PAGE und Immunelektrophorese auf Homogenität untersucht. Für die Molekulargewichtsbestimmung des isolierten PC (nach Andrews,1970) wurde dieselbe Säule verwendet. Sie wurde mit folgenden Eichproteinen kalibriert: Lactatdehydrogenase (140 000), Aldolase (160 000), Urease (480 000) und Thyroglobulin (660 000).

12. Dünnschichtgelchromatographie (DGC)

Die DGC wurde im Labor der Abteilung von Prof. Linzen durchgeführt. Es wurde nach Gebrauchsanleitung der Firma Pharmacia/ Schweden auf einer Apparatur dieser Firma vorgegangen. Das Gel Sephadex G 200 Superfine wurde für die Molekulargewichtsbestimmung verwendet. Die Laufzeit betrug 9 Stunden. Während des Laufes hatte die Platte einen Winkel von 30^{o} zur Horizontalen. Als Eichsubstanzen dienten: Conalbumin (86 000), Aldolase (158 000), Lactatdehydrogenase (140 000), Catalase (230 000), Ferritin (440 000) und Thyroglobulin (660 000). Der Abklatsch mit dem Filterpapier Whatman 3 MM wurde mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

13. Ionenaustauschchromatographie

DEAE-Sephacel wurde in eine Säule (1,6 x 30 cm) gefüllt und mit 0,05 M Tris-HCl äquilibriert. 4-6 ml Proteinlösung mit etwa 5 mg/ml Proteinkonzentration wurden jeweils aufgetragen (siehe Punkt 9). Der PC-Peak wurde mit 0,05 M Tris-HCl, der eine Salzkonzentration von 0,05 M NaCl enthielt, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h in 2 ml Fraktionen eluiert. Die Proteine, die als Verunreinigungen mitausgefällt worden waren, konnten mit 0,05 M Tris-HCl höherer Salzkonzentration (0,25 M NaCl) eluiert werden. Die vereinigten PC-Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration konzentriert und in der PAGE und Immunelektrophorese auf Homogenität untersucht.

14. Analytische Ultrazentrifugation

Die folgenden Versuche wurden von Heinz Decker, Walter Stöcker und Dr. Walter Schartau in der Abteilung von Prof. Linzen mit einer analytischen Ultrazentrifuge, Modell E der Firma Beckmann, ausgerüstet mit photoelektrischem Scanner und Multiplexer, durchgeführt.

a. Sedimentationskoeffizient

Es wurden Doppelsektorzellen mit Filled-Epon-Mittelstücken benutzt, wobei die Temperatur 20°C betrug und die Umdrehungszahlen zwischen 30 000 und 40 000 Upm lagen. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml. Die Sedimentationskoeffizienten wurden zum Teil graphisch nach Elias (1969) bestimmt, zum Teil nur rechnerisch aufgrund fogender Gleichung:

$$s_{(app)} = \frac{2{,}303}{\omega^2} \times \frac{d\lg r_i}{dt}$$

Da mit niedrigen Proteinkonzentrationen in sehr verdünnten Puffern gearbeitet wurde, wurde auf die Berechnung der Sedimentationskonstante $s_{20,w}$ verzichtet. Die Bestimmungen von 6 unabhängigen Läufen wurden gemittelt.

b. Sedimentationsgleichgewichts-Lauf

Das Molekulargewicht von PC wurde nach Yphantis (1960;1964) bestimmt. Das Gleichgewicht wurde nach 4 Stunden bei einer Geschwindigkeit von 5200 Upm bei 20°C erreicht, wobei die Technik des anfänglichen 'overspeeding' angewendet wurde. Aus folgender Gleichung ließ sich das apparente Molekulargewicht berechnen:

$$M_{app} = \frac{2 \times R \times T}{(1-\bar{V} \times \rho)} \times \frac{2{,}303}{\omega^2} \times \frac{d \lg o.D.}{dr^2}$$

wobei 5 unabhängige Messungen gemittelt wurden.
Da die Proteinkonzentration relativ niedrig lag, konnte auf die Extrapolation auf die Konzentration 0 verzichtet werden.
Das partielle spezifische Volumen ($\bar{V}$) des Gesamtmoleküls wurde berechnet, indem das V von Lipid- und Proteinanteil bestimmt wurde.

15. Aminosäureanalyse

Diese Messungen wurden von Dr. W. Schartau mit dem Aminosäure-Analysator Kontron Liquimat III im Vierce Pico Puffer System durchgeführt. Die Protein-Hydrolyse erfolgte in kochender HCl bei 110°C in verschlossenen Ampullen über 24 Stunden. Das Hydrolysat wurde in 0,2 M Na-Citrat Puffer, pH=2,2, gelöst. Die Werte von 2 unabhängigen Messungen, die nicht auf den Hydrolysezeitpunkt 0 bzw. unendlich extrapoliert worden waren, wurden gemittelt und in Mol‰ der gefundenen Aminosäuren ausgedruckt. Tryptophan, Cystein und Prolin wurden nicht bestimmt.

16. Proteinbestimmungen

Der Proteingehalt von konzentrierten Proteinlösungen wurde mit der Biuret-Methode bestimmt. Verdünnte Proteinlösungen wurden nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standard diente jeweils Lab-Trol E. Das Trockengewicht des Apoproteins wurde nach Trocknen im Vakuum bei 70°C gravimetrisch bestimmt.

17. Kohlenhydratbestimmung

Das Gesamt-Kohlenhydrat wurde nach Roe (1955) mit dem Anthron-Reagens bestimmt, wobei Glukose als Standard verwendet wurde.

18. Lipidextraktion und Lipidbestimmung

Die Gesamt-Lipide wurden aus isoliertem PC mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) extrahiert. Einerseits wurde die Methode von Folch et al. (1957), andererseits eine ähnliche Methode von Stratakis (persönliche Mitteilung) angewandt. Die Menge an Gesamt-Lipid, die man auf diese Weise erhielt, wurde auf einer Mikrowaage von Mettler (Modell M 5) bestimmt.

Die verschiedenen Lipidbestandleile wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Es wurden Fertigplatten (Silica-Gel 60, 20 x 20 cm) von Merck verwendet. Die Platten wurden eine Stunde vor Gebrauch 10 min bei 100°C vorerhitzt.

Neutrale Lipide wurden in Petroleumäther-Diäthyläther-Essigsäure (70 : 30 : 2, v/v) (Stratakis, persönliche Mitteilung) aufgetrennt. Die Phospholipide, die in diesem Lösungsmittel am Auftragspunkt liegen blieben, konnten nach ihrer Extraktion aus dem Silica-Gel mit folgendem Lösungsmittel-System aufgetrennt werden: Chloroform-Methanol-Ammoniak (65 : 35 : 5, v/v). Um Diglyceride vom Cholesterin zu trennen, wurde ein Lösungsmittel-System von Freeman und West (1966): Äthyläther-Benzol-Äthanol-Essigsäure (40 : 50 : 2 : 0,2) verwendet.

Für die qualitative Analyse wurden die Lipidflecken mit Jod, Phosphomolybdänsäure, Molybdän Blau oder mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Als Referenzlipide dienten: Diolein (85% 1,3), Triolein, Cholesterin Palmitat, Cholesterin, Stearinsäure, Phosphatidyl Inositol, Phosphatidyl L Serin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin.

Für die quantitative Analyse wurden die einzelnen Lipidflecken, nach Sichtbarmachen mit Joddampf, aus den Silica-Gel Platten ausgekratzt und die Lipide aus dem Gel mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) extrahiert. Das Trockengewicht dieser Lipid-Fraktionen wurde ebenfalls gravimetrisch bestimmt.

C. Ergebnisse

1. Nachweis für die Beteiligung zweier unterschiedlicher Gerinnungsproteine an der Gerinnselbildung

a. Immunologische Untersuchungen des Haemocyten-Gel und des Haemolymph-Clot

Nachweis des Haemocyten-Coagulogen (HC)

Nach mikroskopischen Untersuchungen der Gerinnungsvorgänge bei Insekten, unter anderem durchgeführt von Grégoire und Mitarbeitern (Grégoire, 1970; Grégoire and Goffinet, 1979), läuft die Gerinnung bei Insekten in folgender Weise ab: Nachdem die Gerinnung durch das Platzen der Coagulocyten ausgelöst worden ist, entladen diese Zellen ihren Inhalt explosionsartig in die Umgebung. Daraufhin gerinnt das Plasma in Form von granulärem Material, das Inseln um die veränderten Zellen herum bildet.

Grégoire vermutet, daß die Gerinnung des Plasmas durch die Einwirkung eines Enzyms, das von den Haemocyten freigegeben wird, ausgelöst wird. Untersuchungen, die diese Hypothese bestätigen, liegen jedoch nicht vor. Die Annahme eines Haemocyten-Faktors und eines Gerinnungsproteins aus dem Plasma stützen sich lediglich auf mikroskopisch wahrnehmbare Erscheinungen während der Blutgerinnung. Unklar ist die Rolle, die Haemocyten und Plasma nach den Vorstellungen von Grégoire bei der Gerinnung spielen.

Für uns stellte sich als erstes die Frage, welche Aufgabe die Haemocyten bei der Gerinnung von Leucophaea übernehmen. Zur Klärung dieser Frage war es notwendig, die Haemocyten frei von allen anderen Haemolymphbestandteilen zu untersuchen. Dazu mußten die Hauptbestandteile der Leucophaea-Haemolymphe (siehe Abb. 1) getrennt werden.

Beim Entbluten von Leucophaea gerann normalerweise die Haemolymphe augenblicklich. Durch Vorkühlen der Tiere und Injektion von EDTA war es möglich, die Haemocyten vor dem Platzen zu bewahren, so daß die Gerinnung nicht ablaufen konnte. Haemocyten und

Plasma wurden anschließend durch Zentrifugation bei niedrigen Umdrehungszahlen getrennt.

Die vollständig von den übrigen Haemolymphbestandteilen isolierten Haemocyten konnten durch entsprechende Behandlung zum Platzen gebracht werden. Schon der Kontakt mit fremden Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, mechanische Erschütterung oder Temperaturänderungen genügten zur Desintegration der Zellen. Gezielt wurde das Platzen der Haemocyten ausgelöst durch kurze Ultraschall-Behandlung oder wiederholtes Einfrieren-Auftauen. Beim Platzen bildeten die Haemocyten ein Gel. Dieses Haemocyten-Gel, auch einfach Gel genannt, war von seiner Konsistenz her weich und locker, löslich bei Behandlung mit reduzierenden Agentien, aber unlöslich in bestimmten starken Detergentien, wie zum Beispiel Harnstoff und SDS.

Zur Identifizierung der im Gel enthaltenden Gerinnungssubstanzen wurde das Gel immunologisch untersucht. Da starke Detergentien das Gel nicht auflösten, war es möglich, für die immunologischen Untersuchungen ein mit Harnstoff und SDS gewaschenes Gel herzustellen. Dieses war frei von adsorbierten Proteinen und sonstigen Bestandteilen, wie zum Beispiel Zellresten, stellte also reines Haemocyten-Gerinnungsmaterial dar (siehe auch Punkt 6 in Material und Methoden). Es wurde als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen und für die Immunelektrophorese eingesetzt. Die immunelektrophoretische Auftrennung von Gel (Det. gew.) gegen Gel-Antiserum (A 1) (siehe Abb. 2a) zeigte, daß zwei immunologisch unterscheidbare Komponenten im Gel vorhanden sind.

Bei der nativen Gerinnung, die in Anwesenheit sämtlicher Haemolymphbestandteile (Haemocyten und Plasma) abläuft, bildete sich ein Gerinnsel, das sogenannte Clot, welches dem Haemocyten-Gel sehr ähnlich sieht und auch wie dieses starken Detergentien gegenüber resistent ist. Diese Ähnlichkeit ließ auf gemeinsame Antigene schließen. Das Clot unterschied sich vom Gel durch größere Festigkeit und sein Verhalten reduzierenden Agentien gegenüber. Es löste sich nicht in reduzierenden Harnstoff-Lösun-

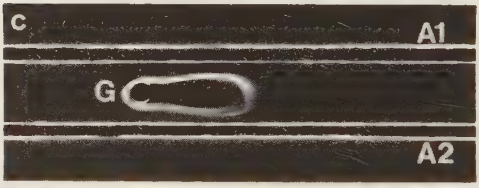
Abb. 2

Immunelektrophoresen der Gel- und Clot-Komponenten.

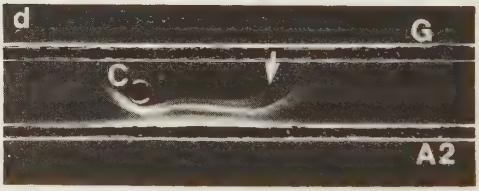
Antigene : **G** Haemocyten-Gel und **C** Haemolymph-Clot.
Antiseren: **A1** gegen Haemocyten-Gel und **A2** gegen Haemolymph-Clot (siehe Tab. 1).

a Zwei Komponenten (Pfeile) sind im Haemocyten-Gel (G) vorhanden.

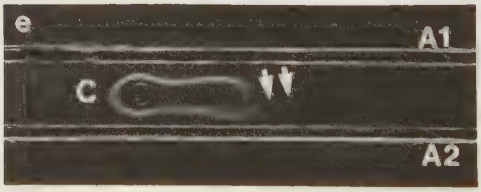
b Im Clot (C) sind zwei zusätzliche Komponenten (Pfeile) im Vergleich zum Gel (G) vorhanden.



c Im Antiserum gegen Clot (A2) sind Antikörper gegen Haemocyten-Gel (G) vorhanden.



d Eine Clot-Komponente ist mit einer-Gel Komponente identisch: Die Präzipitate von Clot (C) und Gel (G in oberer Rille) gehen ineinander über (Pfeil).



e Die zwei zusätzlichen Komponenten im Clot (C), siehe auch b, ergeben nur Präzipitate (Pfeile) mit Antiserum gegen Clot (A2).

gen im Gegensatz zum Gel. Die Frage, ob diese verstärkte Stabilität eventuell durch eine zusätzliche Komponente im Clot zustande kommt, versuchten wir durch einen immunelektrophoretischen Vergleich von Gel und Clot zu klären. Ließ man Gel und Clot als Antigene mit einem Antiserum gegen Clot (A 2) in der Immunelektrophorese laufen (Abb. 2b), so erschienen in der Tat im Clot dem Gel entsprechende Präzipitate. Daneben traten zwei zusätzliche Präzipitate auf.

Eine weitere Elektrophorese machte deutlich, daß Antikörper gegen die Haemocyten-Komponente im Clot-Antiserum (A 2) relativ stark konzentriert vorhanden sind (Abb. 2c), was unsere Vermutung zu bestätigen schien, daß identische Antigene im Gel und im Clot vorhanden sind. Durch einen Identitätstest ließ sich zeigen, daß dieses Gel-Antigen einem Clot-Antigen entspricht (Abb. 2d).

Unsere Vermutung, daß im Clot ein weiteres Protein im Vergleich zum Gel vorhanden ist, wurde durch die Immunelektrophoresen von Abb. 2b,e bestätigt, bei denen die zwei zusätzlichen Antigene im Clot nur auftraten, wenn ein Antiserum gegen Clot verwendet wurde.

Anhand dieser immunelektrophoretischen Tests waren folgende Aussagen möglich: Das Haemocyten-Gel stellt einen Teil des nativen Gerinnsels dar und ist somit identisch mit einem der Gerinnungsproteine (Coagulogene). Wir bezeichneten dieses aus den Haemocyten stammende Gerinnungsprotein als Haemocyten-Coagulogen (HC). Im Clot, dem nativen Gerinnsel, sind darüber hinaus noch ein oder mehrere Gerinnungsproteine enthalten, die wahrscheinlich aus dem Plasma stammen. Durch einen Vergleich von Plasma und Serum sollte diese Frage untersucht werden.

b. Vergleich von Plasma und Serum in der Immunelektrophorese
Nachweis des Plasma-Coagulogen (PC)

Ein Vergleich von Plasma und Serum in der Immunelektrophorese, wobei Plasma (P) und Serum (S) als Antigene mit einem spezifischen Antiserum gegen Plasma-Proteine (A 3b), aufgetrennt wurden,

zeigte, daß dem Plasma fünf, dem Serum dagegen nur vier immunologisch identifizierbare Haemolymph-Proteine zugeordnet werden können (Abb. 3a). Ein Protein ist zusätzlich im Plasma vorhanden und durch ein Präzipitat nahe am Antigenloch gekennzeichnet. Dieses Antigen hat die geringste elektrophoretische Beweglichkeit. Beim Anfärben der Präzipitate mit dem für Lipoproteine spezifischen Sudan Schwarz 10 B färbte sich nur dieses Protein (Abb. 3b,c), was auf seinen Lipidcharakter hindeutet. Da dieses Protein nach der Gerinnung, also im Serum, verschwunden ist, stellt es höchstwahrscheinlich ein Gerinnungsprotein dar.
Wir bezeichneten es als Plasma-Coagulogen (PC). In einer weiteren Immunelektrophorese, bei der die beiden Antiseren A 3 (gegen Haemolymphe) und A 2 (gegen Clot) verglichen wurden (Abb. 3d), ergab das PC auch mit A 2 ein starkes Präzipitat am Antigenloch. Das hieß aber, PC ist ein wesentlicher Bestandteil des nativen Gerinnsels. Durch Absorption der beiden Antiseren A 2 und A 3 mit Serum und mit Haemocyten konnten sie monospezifisch gegen PC gemacht werden (Abb. 3e). PC war hierdurch eindeutig als Plasma-spezifisches Gerinnungsprotein identifiziert. Die Vermutung lag nahe, daß dieses PC identisch ist mit den im Clot zusätzlich zum HC vorhandenen Clot-spezifischen Antigenen (siehe Abb. 2e). Durch einen Identitätstest, bei dem Clot- und Plasma-Antigene kombiniert wurden, konnte die Identität der Clot-spezifischen Präzipitate mit dem PC nachgewiesen werden (Abb. 3f).
Damit war neben dem HC das zweite Gerinnungsprotein des nativen Haemolymph-Clot, das PC, identifiziert.

c. Vergleich von Plasma und Serum in der PAGE

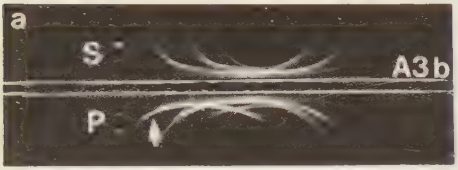
Kombination von PAGE und Immundiffusion zur Identifizierung des PC-Präzipitats

Plasma und Serum wurden auch mit Hilfe der Plattengelelektrophorese aufgetrennt. Am geeignetsten erwies sich ein Gradientengel von 5-10% Polyamidkonzentration mit 3%igem Sammelgel. Wie in Abb. 4 ersichtlich, unterscheiden sich Plasma und Serum auch bei

Abb. 3

Immunelektrophoresen von Plasma, Serum und Clot.

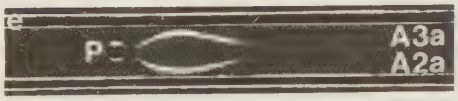
Antigene : **P** Plasma, **S** Serum und **C** Clot.
Antiseren: Es wurden Antiseren von verschiedenen Kaninchen eingesetzt. **A2** gegen Haemolymph-Clot, **A3** gegen Haemolymphe, **A3*** wie A3, jedoch ohne Antikörper gegen eines der Haemolymph-Proteine, **A2a** und **A3a** spezifische Antiseren gegen **PC**, **A3b** spezifisches Antiserum gegen Plasma-Proteine (siehe Tab. 1).



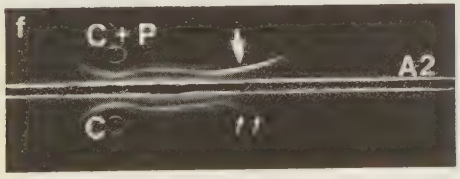
a Vergleich von Plasma (P) (5 Proteine) und Serum (S) (4 Proteine). Pfeil kennzeichnet PC, das nur im Plasma vorhanden ist.

b,c Plasma-Proteine, in **b** ungefärbt und in **c** mit Sudan Schwarz angefärbt. Pfeile kennzeichnen PC. Mit Sudan Schwarz wird nur PC angefärbt.

d Antiserum gegen Clot (A2) gibt ein starkes Präzipitat mit PC (Pfeil) und nur sehr schwache Präzipitate mit den übrigen Plasma-Proteinen.



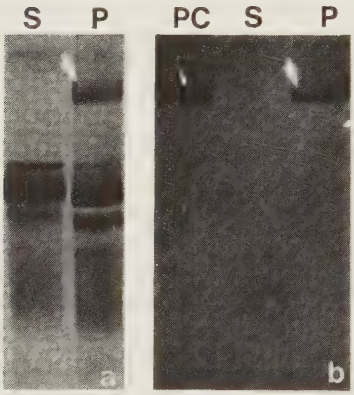
e Die mit Serum und Haemocyten absorbierten Antiseren A2a und A3a sind monospezifisch gegen PC.



f Plasma (P) und Clot (C) wurden im oberen Antigenloch hintereinander aufgetrennt. Der Pfeil kennzeichnet das identische Präzipitat von PC und den zwei Clot-spezifischen Antigenen (2 kleine Pfeile).

Abb. 4

Vergleich von Plasma (P) und Serum (S) in der PAGE.

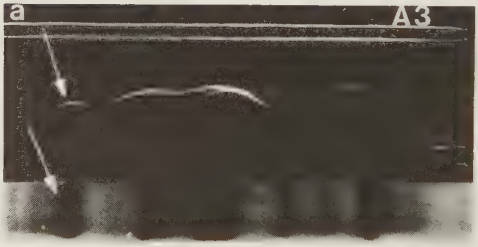


a,b Die Auftrennung erfolgte in einem 5 - 10 %igen Gradientengel mit 5 %igem Sammelgel. Nach dem Lauf wurde das Gel auseinander geschnitten und ein Teil mit Coomassie B. Blue gefärbt (a), der andere Teil mit Sudan Schwarz (b). In b wurde auch noch isoliertes PC aufgetrennt (kleiner Pfeil). Die Pfeile kennzeichnen PC. Mit Sudan Schwarz wird nur die PC-Bande angefärbt.

Abb. 5

Kopplung von PAGE und Immundiffusion.

Plasma (**P**) wurde in der PAGE in einem 2 - 16 %igen Fertiggel (Pharmacia) aufgetrennt. Dadurch ergibt sich ein von Abb. 4a unterschiedliches Bandenmuster für Plasma. **A3** Antiserum gegen Haemolymphe, **A3a** = gegen PC spezifisches Antiserum.



a Präzipitate aller Plasma-Proteine. Die Pfeile kennzeichnen das PC.

b Mit monospezifischem Antiserum gegen PC wird nur ein Präzipitat gebildet, das dem PC entspricht (Pfeil). Dadurch ist die PC-Bande im Acrylamidgel identifiziert (Pfeil).

dieser Technik hauptsächlich durch eine Bande. Diese nur im Plasma auftretende Bande, die am wenigsten ins Gel eingewandert ist und damit auf ein hohes Molekulargewicht hinweist, ist offensichtich PC und sollte damit dem PC-Präzipitat in der Immunelektrophorese entsprechen. Diese PC-Bande in der PAGE ist ebenfalls als einzige Plasma-Proteinbande spezifisch anfärbbar mit Sudan Schwarz 10 B (Abb. 4b), stellt also ein Lipoprotein dar.
Die Identität dieser PC-Bande in der PAGE ließ sich durch eine Kopplung von PAGE und Immundiffusion nachweisen (Abb. 5a,b).
Zusammenfassend läßt sich über diese elektrophoretischen Untersuchungen sagen:
Bei Leucophaea besteht das Clot aus zwei verschiedenen Proteinen. Das eine stammt aus den Haemocyten, HC, das andere aus dem Plasma, PC, wobei letzteres ein Lipoprotein von offensichtlich hohem Molekulargewicht darstellt.
Überraschend war das Ergebnis dieser Untersuchungen insofern, als bisherige Arbeiten der Arthropoden-Blutgerinnung nur auf ein Protein als Bestandteil des Blutgerinnsels hinwiesen.

2. In vitro Testsystem mit Haemocyten-Gel und Haemolymph-Plasma

Im Gegensatz zu den isolierten Haemocyten konnte das Plasma, nachdem es vollständig von den Haemocyten getrennt worden war, nicht zur Gerinnung gebracht werden. PC gerann nur in Anwesenheit von HC. Diese Tatsache und Immunofluoreszenzuntersuchungen (siehe Bohn et al., 1981), die besagten, daß HC und PC in den Gerinnungsinseln an exakt derselben Stelle liegen, ließen eine Interaktion beider Coagulogene bei der Gerinnsel-Bildung vermuten. Die Frage nach der Art der Bindung, die bei dieser Interaktion geschlossen wird, versuchten wir zu klären, indem wir die Bedingungen der Clot-Bildung genauer untersuchten. Dazu wurde ein Testsystem entwickelt, mit dem ein Teil des Gerinnungsvorgangs in vitro nachvollzogen werden sollte. In diesem wurden Ionenbedingungen, zum Beispiel die Art der Ionen und die Ionenstärke, wie

auch pH-Bedingungen und Hemmstoffe für verschiedene Bindungstypen, untersucht.

In dem Testsystem wurde unlösliches HC in Form von Haemocyten-Gel mit Plasma kombiniert. Hierbei wurde ein großer Teil des PC aus dem Plasma vom HC gebunden, ersichtlich am Verschwinden des PC aus dem Plasma im Überstand nach der Reaktion. Der Anteil des PC im Überstand nach der Zentrifugation wurde durch quantitative Radialimmundiffusion bestimmt. Die Reaktion wurde bis zu einem bestimmten % Anteil PC im Überstand (etwa 0-30%) als vollständig angesehen. 100% relativer PC Anteil bedeutete vollständige Hemmung der Reaktion.

Zuerst wurde der Einfluß von Ionen, pH-Werten und Hemmstoffen für bestimmte Bindungen (SH-Hemmstoffe und Transamidationshemmstoffe) getestet. Tab. 2 zeigt das Ergebnis eines Tests, in dem die Wirkung verschiedener pH- Werte auf die Reaktion untersucht wurde. Da der Tris-HCl Puffer nur in einem bestimmten pH-Bereich zu verwenden ist, wurde auch Veronal-Azetat Puffer eingesetzt, der bei pH = 7,3 eine dem Tris-HCl Puffer entsprechende Reaktion ergab. Bei dem Test wurden jeweils 0,1 g Haemocyten-Gel und 0,1ml Plasma, das zuvor gegen den zu testenden Puffer dialysiert worden war, zusammengegeben. Nach 30 min Reaktion bei Raumtemperatur wurde das Sediment abzentrifugiert und der Überstand auf seinen Gehalt an PC hin mittels Radialimmundiffusion untersucht. Bei der Dialyse von Plasma gegen Puffer mit pH = 5,2 fiel Protein aus, wahrscheinlich auch PC, so daß keine Reaktion mit dem Gel stattfinden konnte. Es zeigte sich, daß bei stärker alkalischem pH die Reaktion gehemmt wurde und bei neutralem pH optimal war. Erwähnt werden muß, daß die pH-Bedingungen bei der Reaktion durch das Mischen mit Haemocyten-Gel noch verändert wurden.

Der Einfluß von Hemmstoffen auf die Reaktion wurde in den folgenden Versuchen untersucht: Zwei Beispiele für Hemmstoffe sind in Tab. 3 angegeben. Hier wurden Glycinamid (Transamidationshemmstoff) und N-Ethylmaleimid (SH-Hemmstoff) getestet.

Tab. 2

Test der Reaktion von Haemocyten-Gel und PC bei verschiedenen pH-Werten

getesteter Puffer	pH vom Puffer	rel. Gehalt an PC im Überstand (%)
Veronal-Azetat 0.05M	8.9	105.0
	8.3	84.0
	7.3	16.5
Tris-HCL 0.05M	8.6	91.0
	8.3	84.0
	7.2	17.0

Tab. 3

Wirkung von Hemmstoffen auf die Reaktion von Haemocyten-Gel und PC

Es wurden Glycinamid, ein Transamidationshemmstoff, und N-Ethyl-maleimid, ein SH-Hemmstoff, getestet.

Zum Teil Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

Hemmstoff	Konzentration (Mol)	Reaktionszeit (min)	rel. Gehalt an PC im Überstand (%)
Glycinamid	0.0001	30	22.0 ± 4.2
	0.001	30	18.0 ± 7.0
	0.005	60	26.8 ± 10.2
	0.01	30	43.6 ± 12.4
	0.05	<1	41.0 ± 11.0
	0.05	30	90.0 ± 11.5
	0.05	60	84.0 (nur 1 Wert)
	0.05	120	82.5 (nur 1 Wert)
	--	30	19.0 ± 5.2 (Kontrolle)
N-Ethyl-maleimid	0.0001	30	22.0 (nur 1 Wert)
	0.001	30	23.0 (nur 1 Wert)
	0.01	30	36.0 (nur 1 Wert)
	0.05	30	64.0 (nur 1 Wert)
	--	30	21.5 (nur 1 Wert) (Kontrolle)

Eine eindeutige Hemmung scheint erst bei relativ hohen Konzentrationen (0,01-0,05 M) einzutreten, wobei die Reaktionszeit keine Rolle spielt. Andere Hemmstoffe, wie zum Beispiel Glycinmethylester oder p-Chloromercuriphenylsulfonsäure zeigten auch erst bei Konzentrationen ab 0,05 M eine Hemmwirkung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde der Einfluß von Ionen auf die Reaktion untersucht, da Ca^{2+}-Ionen in der Regel bei Gerinnungsprozessen eine wichtige Rolle spielen.

Versuche mit EDTA, das mit zweiwertigen Ionen Komplexe bildet, führten zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den schon getesteten Hemmstoffen: Die Konzentration von EDTA mußte sehr hoch sein (0,05 M), damit eine Hemmung der Reaktion eintrat. Das schien darauf hinzudeuten, daß Ca^{2+}-Ionen, die ja schon durch geringere Konzentrationen von EDTA gebunden worden wären, keine Rolle bei dieser Reaktion spielen. In dem nächsten Versuch wurde die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von $CaCl_2$ auf die Reaktion getestet. Tab. 4 zeigt die Wirkung von $CaCl_2$. Ähnliche Werte ergeben Versuche mit $MgCl_2$. Wie man aus der Tabelle ersieht, scheint mit zunehmender Konzentration von $CaCl_2$ eine zunehmende Hemmung der Reaktion stattzufinden: Während bei 0,0001 M $CaCl_2$ die Reaktion normal verläuft, ist bei 0,05 M $CaCl_2$ eine vollständige Hemmung eingetreten.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien bei allen bisher getesteten Agentien die Konzentration die Hemmwirkung zu verursachen.

Um weitere Aufschlüsse über die Bindungsbeziehungen beider Coagulogene in dieser Reaktion zu gewinnen, wurde versucht, die Reaktionszeit zu bestimmen, das heißt die Zeit, die zur vollständigen Reaktion zwischen Gel und PC notwendig ist. Plasma und Haemocyten-Gel wurden bei diesem Test zu gleichen Teilen gemischt. Nach bestimmten Zeiten wurde die Reaktion (Rühren des Gemisches bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer) durch Zentrifugation (15 min, 17 000 x g, 5°C) beendet.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen besagte, daß schon nach 1-2 Minuten die Interaktion von HC und PC abgeschlossen ist (Tab.5).

Tab. 4

Test unterschiedlicher Konzentrationen von $CaCl_2$ auf die Reaktion von Haemocyten-Gel und Plasma

Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

$CaCl_2$ (Mol)	rel. Gehalt an PC im Überstand (%)	
0.0001	20.5	± 5.0
0.001	24.0	± 3.4
0.01	80.5	± 2.5
0.05	98.0	(nur 1 Wert)
0.1	110.0	(nur 1 Wert)
–	18.5	± 2.5 (Kontrolle)

Tab. 5

Bestimmung der Reaktionszeit zwischen Haemocyten-Gel und PC

Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

Reaktionszeit (min)	rel. Gehalt an PC im Überstand (%)	
1	22.6	± 2.5
2	17.2	± 3.1
5	14.0	± 2.0
10	12.4	± 1.5
15	14.0	± 1.8
20	18.0	± 2.5
30	16.4	± 3.2
60	16.0	± 3.0 (Kontrolle)

Bei allen getesteten Reaktionszeiten ließ die Konzentration an PC im Überstand nach der Reaktion auf eine vollständige Reaktion schließen. Berücksichtigt man jedoch noch die 15-minütige Zentrifugationszeit, in der eventuell noch zu Beginn die Reaktion weiterlaufen kann, so müßte man von einer 2-5-minütigen Reaktionszeit ausgehen. Um auszuschließen, daß während der Zentrifugation die Reaktion weiterlaufen kann, wurde in einer weiteren Versuchsreihe eine 0,4M EDTA-Lösung, die sich als guter Hemmstoff erwiesen hatte, als Unterbrecher des Reaktionsablaufes nach bestimmten Zeiten zum Reaktionsgemisch gegeben. Das überraschende Ergebnis dieses Versuches war , daß zu allen Zeiten, auch nach 20 oder 30 min, wo die Reaktion nach vorrangegangenen Studien schon hätte abgeschlossen sein müssen (siehe Tab. 5), die PC-Konzentration im Reaktionsgemisch sehr hoch war. Das konnte aber nur bedeuten, daß die Bindung von HC und PC nachträglich durch die hochmolare EDTA-Lösung getrennt worden war.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die bei den vorhergehenden Versuchen auftretende Hemmwirkung ab einer Konzentration von 0,05 M, sowohl für EDTA, als auch für $CaCl_2$, $MgCl_2$ und für verschiedene Hemmstoffe (siehe auch Tab. 3 und 4), so erweist sich der Einfluß der hohen Konzentration, der allen gemeinsam ist, als entscheidend. Danach sieht es so aus, daß bei der Reaktion von Gel und Plasma die Bildung einer Bindung durch hohe Ionenkonzentrationen gestört wird und eine schon geschlossene Bindung sogar wieder gelöst werden kann, wie das letzte Experiment zeigt.

Aufgrund dieser Ergebnisse traten Zweifel an unserem Testsystem auf. Die Gerinnung unter diesen Bedingungen schien unvollständig. Durch den Einsatz von reduzierenden Reagentien wie DTT gelang dann der Nachweis, daß das Reaktionsprodukt aus Gel und Plasma nicht, wie zuerst angenommen, dem Clot, das heißt dem nativen Gerinnsel entsprach (Bohn et al., 1981). Im Gegensatz zum Clot war das Gel-Plasma Gerinnungsprodukt löslich in reduzierenden Reagentien, was bedeutete, daß in diesem Fall die Bindung zwischen HC und PC von der im Clot existierenden Bindung verschieden

sein mußte. Wir nannten diese Art der Interaktion von HC und PC Assoziation.
Da diese Bindung durch eine hochmolare EDTA-Lösung wieder gelöst werden konnte, wurden Assoziate gezielt mit Lösungen und Puffern unterschiedlicher Konzentration behandelt, um weitere Aufschlüsse über die Dissoziation, wie wir das Herauslösen von PC aus dem Assoziat nannten, zu gewinnen. Es wurden auch verschiedene pH-Werte getestet, da nach dem Hemmeffekt bei alkalischem pH (siehe Tab. 2) zu erwarten war, daß Puffer mit stark alkalischem pH die Bindung auch wieder zu lösen vermögen. Die Versuche ergaben, daß sowohl konzentrierte EDTA-Lösungen, als auch Harnstoff-Lösungen und höhermolarer (0,1 M) Puffer und Puffer mit alkalischem pH die Bindung zwischen HC und PC wieder zu lösen vermögen (Tab. 6). Ausführliche Untersuchungen dazu, unter anderem auch von Josef Weber (Zulassungsarbeit, 1980) durchgeführt, brachten folgende Aussagen: Bei der Behandlung der Assoziate von PC und HC mit Pufferlösungen verschiedener pH-Werte kann PC ab pH=8,2 wieder dissoziieren, wobei die Menge des abdissoziierten PC mit steigendem pH zunimmt. Im sauren Bereich dissoziiert kein PC ab und im neutralen Bereich nur geringe Mengen. Mit hochmolaren EDTA-Lösungen und bestimmten hochmolaren Puffern und Detergens-Lösungen war dieser Dissoziationseffekt ebenfalls zu erreichen.
Durch diesen 'Auswascheffekt' unterschied sich das HC-PC-Assoziat ebenfalls grundlegend vom Haemolymph-Clot, aus dem in keinem Fall PC wieder herausgelöst werden konnte.

3. Isolierung von Plasma-Coagulogen durch Dissoziation

a. Assoziation und Dissoziation von Haemocyten-Gel und PC

Mit der quantitativen Methode der Radialimmundiffusion konnte in der Waschlösung nach Behandlung des Assoziats mit hochmolaren Lösungen zwar eine hohe PC-Konzentration festgestellt werden, eine Aussage über die Konzentration weiterer Haemolymph-Proteine konnte in diesem Fall jedoch nicht gemacht werden. Immunelektro-

Tab. 6

Wirkungen verschiedener Waschlösungen auf das HC-PC Gerinnungsprodukt

Haemocyten-Gel und Plasma (29.0 mg/ml Proteinkonzentration) wurden im Vol-Verhältnis 1:1 gemischt. Nach 1 1/2 h Reaktion bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert und das Sediment zweimal mit der 10-fachen Menge an 0.05 M Tris-HCL (V/V) gewaschen. Das Assoziat ließ man mit der doppelten Menge (V/V) Waschlösung 30 min bei Raumtemperatur reagieren. Der Überstand nach Zentrifugation wurde in der quantitativen Radialimmundiffusion getestet.

Zum Teil Mittelwert aus 2 Bestimmungen.

Waschlösung	pH der Waschlösung	rel. Gehalt an PC im Überstand (%)
Tris-HCL 0.05 M	7.3	0 ± 0
Veronal-Azetat 0.05M	4.2	0 ± 0
	5.2	0 ± 0
	7.3	0 ± 0
	8.7	10.6 ± 5.5
Tris-Maleat 0.1 M	7.3	16.0 (nur 1 Wert)
8 M Urea in Tris-HCL	7.3	27.8 ± 3.5
0.2 M EDTA in Tris-HCL		32.5 (Mittel aus 3 Messungen)

phoretische Untersuchungen der Waschlösung zeigten dann, daß es sich bei den dissoziierten Proteinen hauptsächlich um PC handelte. In einigen Präparationen waren noch geringfügige Anteile anderer Haemolymph-Proteine vorhanden. Auf diese Weise war eine Methode für die Isolation von PC vorgegeben.
Es wurden verschiedene hochmolare Puffer und solche mit stark alkalischem pH, wie auch hochmolare EDTA-Lösungen für die Auswaschversuche getestet. 0,2 M Tris-HCl erwies sich am geeignetsten für die Dissoziation von PC, da die Proteinlösung ohne zusätzliche Dialyse für die Gelchromatographie und die Elektrophorese weiterverwendet werden konnte. Falls in der Immunelektrophorese der dissoziierten PC-Lösung noch Spuren von Verunreinigungen durch andere Haemolymph-Proteine zu sehen waren, wurden diese mit Hilfe der Gelfiltration abgetrennt.
Die Ausbeute bei diesem Isolationsverfahren schwankte in gewissen Grenzen. Sie betrug, bezogen auf das eingesetzte PC, etwa 20-30%. Bei einem Ansatz mit 120 Tieren (etwa 1,5 g Gel) entsprach das etwa 10 ml PC-Lösung mit 1,2 mg/ml Proteinkonzentration.

b. Reinigung von PC durch Säulengelchromatographie

Da die auf diese Weise isolierte PC-Lösung in immunelektrophoretischen Tests teilweise noch schwache Präzipitate zeigte, mußte das Protein von diesen Verunreinigungen durch andere Haemolymph-Proteine gereinigt werden. Da sich das PC-Präzipitat nahe am Antigenloch befand, und die Auftrennung in der PAGE (Abb. 4) eine Bande nahe am Ursprung ergab, lag die Vermutung nahe, daß es sich beim PC um ein hochmolekulares Protein handelt. Die Säulengelfiltration schien deshalb eine geeignete Methode für die Abtrennung der Fremdproteine vom PC zu sein, da hierbei die Moleküle ihrer Größe nach getrennt werden.
Obgleich nicht alle PC-Präparationen nach der immunelektrophoretischen Auswertung verunreinigt waren, wurden sie sicherheitshalber auf die Säule gegeben. In der Regel ergaben sich zwei Peaks im Elutionsprofil. Der erste, sehr viel größere Peak enthielt die

PC-Fraktionen. Die Konzentration der Bestandteile, die den zweiten sehr kleinen Peak verursachten, war so gering, daß kein immunelektrophoretischer Nachweis möglich war. Die PC-Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert für elektrophoretische Untersuchungen.

c. Homogenitätsnachweis von gereinigtem PC in Immunelektrophorese, PAGE und durch Sedimentationsläufe

Konzentrierte PC-Lösungen aus der Gelchromatographie mit etwa 1-3 mg/ml Proteinkonzentration wurden in der Immunelektrophorese auf Homogenität getestet. Trennte man PC-Antigen gegen ein Antiserum gegen die gesamte Haemolymphe (A 3) auf, so bildete sich nur ein Präzipitatbogen (Abb. 6a).

Die PAGE diente als weiteres Verfahren zum Nachweis, daß PC in reiner Form vorlag. Beim Auftrennen von PC war nur die schon im Plasma identifizierte PC-Bande sichtbar (Abb. 7a).

Vier unabhängige Sedimentationsläufe in der Ultrazentrifuge bestätigten ebenfalls die Homogenität des isolierten PC. Da verschieden große Proteine unterschiedlich schnell sedimentieren, konnte mit dieser Methode festgestellt werden, ob ein oder mehrere Proteine vorhanden waren. Es wurde ein Sedimentationskoeffizient (nicht korrigierter Wert) von s_{app} = 7,7 bestimmt. Dieser Wert wurde aus 6 Läufen berechnet (2 Läufe wurden mit präzipitiertem PC durchgeführt). Auf die Extrapolation auf reines Wasser und auf die Proteinkonzentration 0 wurde verzichtet, da sie nur mit größerem Aufwand durchzuführen gewesen wäre.

4. Isolierung von Plasma-Coagulogen durch Präzipitation

Da PC in präparativem Maßstab isoliert werden sollte, wurden weitere Versuche unternommen, eine relativ einfache Methode zu finden, PC mit größerer Ausbeute und geringerem Zeit- und Materialaufwand zu isolieren als bei dem schon beschriebenen Assoziation-Dissoziations-Verfahren.

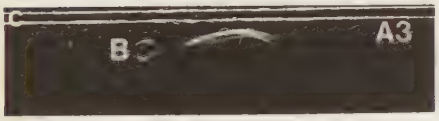
Abb. 6

Immunelektrophoresen von PC-Präparationen.

Antiseren: **A3** gegen Haemolymphe und **A4** gegen Haemocyten.

a Oberes Antigenloch: Als Antigen wurde in der Gelfiltration gereinigtes PC, nach dem Assoziation - Dissoziations-Verfahren isoliert, eingesetzt.
Unteres Antigenloch: Im Vergleich dazu Gesamt-Plasma (P).

b Oberes Antigenloch: S = Präzipitat nach der Dialyse von Plasma gegen niedermolare Tris - HCl-Lösung, gelöst in 0.05 M Tris - HCL. Zusätzlich zum PC (Pfeil) sind noch Verunreinigungen durch Haemolymph-Proteine vorhanden.
Unteres Antigenloch: A = Peak A der Ionenaustauschchromatographie stellt gereinigtes PC dar (siehe Abb. 9).



c B = Peak B der Ionenaustauschchromatographie enthält die zusammen mit PC ausgefällten Haemolymph-Proteine (siehe Abb. 9).

d Als Antigen wurde in der Ionenaustauschchromographie gereinigtes PC (entspricht A), nach dem Präzipitations-Verfahren isoliert, eingesetzt. Weder mit Antiserum gegen Haemolymphe (A3) noch mit Antiserum gegen Haemocyten (A4) sind Verunreinigungen zu erkennen.

e Als Antigen wurde S_w = Präzipitat nach Ausfällen von PC mit Wasser,gelöst in 0.05 M Tris - HCL, eingesetzt. Neben PC (Pfeil) sind noch weitere Haemolymph-Proteine relativ stark konzentriert vorhanden.

Abb. 7

Polyacrylamidgelelektrophorese

Vergleich von Plasma (**P**) und gereinigtem **PC** in 5 - 10 %igen Gradientengelen.

a **PC** nach dem Assoziation-Dissoziations-Verfahren isoliert.

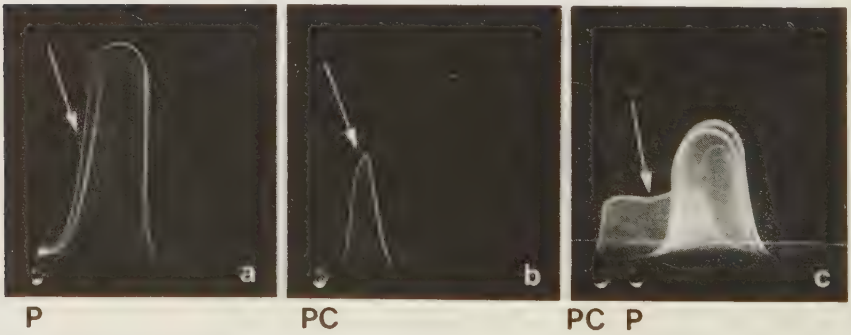
b **PC** nach dem Präzipitations- Verfahren isoliert.

Abb. 8

Zweidimensionale Immunelektrophorese. Antiserum gegen Haemolymphe (A3).

a,b Vergleich von Plasma (**P**) und gereinigtem **PC**. Die Pfeile kennzeichnen den PC-Peak.

c Identifizierung des **PC** im Plasma durch einen Tandem-Cross Lauf von PC und Plasma (P). Pfeil: Übergang vom isolierten PC in den im vollständigen Plasma enthaltenen PC-Anteil.



Da das Ausfällen mit Salzen, speziell die Ammonsulfatfällung, eine relativ einfache und gebräuchliche Protein-Isolationsmethode ist, wurde versucht, PC aus dem Plasma durch schrittweise ansteigende Ammonsulfat-Konzentration auszufällen. Leider war in unserem Fall keine befriedigende Trennung des PC von den übrigen Plasmaproteinen zu erreichen.

a. Ausfällen mit Wasser

Da PC nach spezifischen Anfärbungen in der Immunelektrophorese und in der PAGE offensichtlich ein Lipoprotein mit relativ hohem Lipidgehalt darstellte, lag es nahe, eine für Lipoproteine spezifische Isolationsmethode zu wählen. Die Tendenz von Lipoproteinen, in Lösungen geringer Ionenstärke zu präzipitieren, wurde ausgenutzt, PC durch Zugabe von destilliertem Wasser aus dem Plasma auszufällen. Bei Zugabe unterschiedlicher Mengen eisgekühlten Wassers zu Plasma-Lösungen unterschiedlicher Konzentration fiel zwar ein beträchtlicher Anteil des PC aus, aber es traten Schwierigkeiten auf: Zum größten Teil entstand ein irreversibles PC-Aggregat. Selbst mit hochmolaren Puffern war nur ein geringer Teil des Proteins wieder in Lösung zu bringen. Darüber hinaus waren noch erhebliche Mengen an mitausgefällten Haemolymph-Proteinen in dieser Proteinlösung enthalten (Abb. 6e). Diese Isolationsmethode erwies sich also auch als ungeeignet.

b. Isolierung durch Dialyse gegen niedermolare Tris-HCl-Lösung

Anstatt Lipoproteine durch direkte Zugabe von Wasser auszufällen, gab es auch noch die schonendere Möglichkeit, gegen Wasser zu dialysieren. Im Falle von PC ergaben die Dialyseversuche mit destilliertem Wasser jedoch nicht reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich Menge und Art der ausgefällten Proteine. Möglicherweise war dies unter anderem auf die erheblichen pH-Schwankungen des destillierten Wassers (pH = 5-7) zurückzuführen. Deshalb wurde gegen eine sehr verdünnte Tris-HCl-Lösung mit konstantem pH dialysiert. Eine 0,001 M Tris-HCl-Lösung mit pH= 5 oder 6 erwies

sich als geeignet. Das entstehende Sediment, das allerdings auch noch Verunreinigungen von mitausgefällten Haemolymph-Proteinen enthielt (Abb. 6b), löste sich in 0,05 M Tris-HCl nur zum Teil. Etwa 40-70% der aggregierten Proteine lösten sich.
0,2 M Tris-HCl oder 0,2 M EDTA-Lösung in Tris-HCl lösten zwar einen größeren Anteil der aggregierten Proteine, trotzdem wurde 0,05 M Tris-HCl verwendet, da die Proteinlösung anschließend zur Reinigung des PC von Fremdproteinen auf eine Ionenaustauschsäule gegeben wurde, die mit diesem Puffer äquilibriert war. So blieb ein Dialyseschritt erspart.

c. Reinigung von PC in der Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie erwies sich als geeignete Methode zur Nachreinigung der PC-Lösung. Die Vorteile lagen in der Schnelligkeit (eine Säulenlänge von 30 cm erwies sich als ausreichend) und der hohen Trennschärfe. Abb. 9 zeigt eines der Elutionsprofile. Die Ladungsunterschiede zwischen PC und den übrigen Proteinen waren so groß, daß mit nur zwei verschiedenen Salzkonzentrationen die Fraktionen in deutlichem Abstand vom Austauscher abgelöst werden konnten.

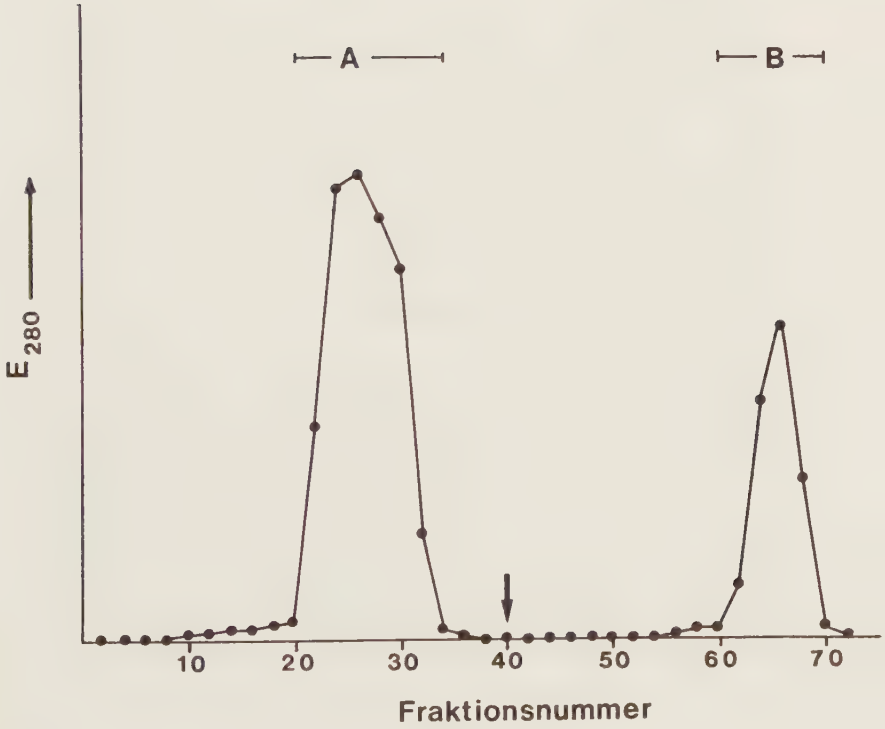
d. Homogenitätsnachweis von gereinigtem PC in Immunelektrophorese und PAGE

Die vereinigten und mittels Ultrafiltration konzentrierten PC-Fraktionen (Peak A in Abb. 9) zeigten in der eindimensionalen Immunelektrophorese keine Verunreinigungen mehr (Abb. 6b). Abb.6c zeigt die mitausgefällten Proteine (Antigen B entspricht Peak B in Abb. 9).
Da es denkbar war, daß die PC-Präparation eventuell noch durch Haemocyten-Proteine verunreinigt war, die bei der Dialyse zusammen mit PC präzipitiert worden waren, wurde auch ein Antiserum gegen Haemocyten (A 4) getestet (Abb. 6d). In diesem Fall bildete sich kein Präzipitat mit PC, das hieß aber, PC lag in einer immunelektrophoretisch reinen Form vor.

Abb. 9

Trennung der PC-Fraktion **A** von den mitausgefällten Haemolymph-Proteinen **B** durch Ionenaustauschchromatographie über DEAE Sephacel.

Fraktion A (PC) wurde mit 0.05 M Tris-HCl, 0.05 M NaCl eluiert.
Pfeil: Beginn der Elution von Fraktion B mit 0.05 M Tris-HCl, 0,25 M NaCl.



Auch in der zweidimensionalen Immunelektrophorese war nur ein Peak sichtbar (Abb. 8b). Ein Tandem-Cross Lauf, bei dem PC und Plasma gleichzeitig hintereinander aufgetrennt wurden, zeigte die Identität des isolierten PC mit dem Peak im Plasma, der dem PC entsprach (Abb. 8c). Auch mit Hilfe der PAGE konnte, wie schon beim dissoziierten PC, eine Bande für das präzipitierte PC nachgewiesen werden (Abb. 7b).
PC lag auch nach diesem Isolationsverfahren als homogenes Protein vor.
Die Proteinkonzentration im aufgelösten Sediment deutete auf eine PC-Ausbeute von etwa 18% hin, bezogen auf die eingesetzte Menge PC, wobei der Anteil an mitausgefällten Proteinen noch abzuziehen wäre. Diese Ausbeute verringerte sich nach der sich anschließenden Ionenaustauschchromatographie nochmals auf etwa 6-9%. Diese geringe Ausbeute an isoliertem PC ist sicher zum großen Teil auf die leichte Aggregationsfähigkeit des PC bei geringen Ionenstärken zurückzuführen. Da bei diesem Isolationsverfahren in 0,05 M Tris-HCl gearbeitet werden mußte, fiel bei jedem Schritt eine erhebliche Menge an PC aus und ließ sich nicht wieder in Lösung bringen. Beobachtet worden war auch die Neigung des PC, ab einer Konzentration von etwa 2 mg/ml irreversibel zu aggregieren, speziell nach Einfrier-Auftau Vorgängen.

5. Nachweis für die Reaktionsfähigkeit von isoliertem PC

Es war nun möglich, gereinigtes PC mit Hilfe zweier unterschiedlicher Isolationsmethoden herzustellen. Die Frage war nur, ob dieses PC seine Funktion als Gerinnungsprotein noch ausüben konnte, oder ob es durch die Isolationsprozeduren soweit verändert worden war, daß es nicht mehr mit HC zum Clot reagieren konnte.
Wie schon in Punkt 2 beschrieben, entsprach das Gerinnungsprodukt aus Gel und PC nicht dem nativen Clot. Setzte man in das in-vitro-Testsystem intakte isolierte Haemocyten statt Haemocyten-

Gel ein, und waren Ca^{2+}-Ionen anwesend, so entstand ein Gerinnungsprodukt, Clot, das ebenfalls HC und PC enthielt, im Gegensatz zum Assoziat aber dem natürlichen Clot in seiner Stabilität glich. Es konnte wie dieses mit reduzierender DTT-Lösung nicht wieder aufgelöst werden.

Um die Gerinnungsfähigkeit von PC nachzuweisen, mußte das Protein in diesem Testsystem mit isolierten Haemocyten kombiniert werden. Kurz zu den Reakionsbedingungen, unter denen dieser in-vitro-Gerinnungsvorgang abläuft, ausführlichere Informationen dazu von Bohn und Barwig (in press):

Ein Teil isolierte Haemocyten, die mehrere Male mit Medium gewaschen worden waren, wurde mit zwei Teilen Plasma gemischt, das eine Proteinkonzentration von 100 mg/ml (etwa 150 Units) hatte und gegen 0.2 M Tris-HCl, 5 mM Ca^{2+}, dialysiert worden war. Die Gerinnung wurde induziert durch zweimaliges Einfrieren-Auftauen dieses Gemisches. Mit anschließender Zentrifugation war die Reaktion beendet. In drei verschiedenen Experimenten (siehe Punkt 8a in Material und Methoden) wurde dann die Vollständigkeit der Gerinnung überprüft.

Um die Reaktionsfähigkeit von PC zu beweisen, mußte dieses unter entsprechenden Bedingungen wie Plasma mit Haemocyten kombiniert werden. Dazu war es zunächst notwendig, PC auf die Konzentration vom eingesetzten Plasma einzustellen, also auf einen Wert von 150 Units, was einer PC Proteinkonzentration von 5-7 mg/ml entsprach (siehe Punkt 10). Hierin lag die Hauptschwierigkeit des Versuches, da, wie schon erwähnt, PC bei hohen Konzentrationen die Tendenz zur irreversiblen Aggregation zeigte. Deshalb mußten für diesen Versuch erhebliche Mengen an isoliertem PC zur Verfügung stehen. Es konnten drei unabhängige Versuche mit hochkonzentriertem PC durchgeführt werden, wobei einmal präzipitiertes und zweimal dissoziiertes PC eingesetzt wurde. In den Experimenten ließ man parallele Plasma-Proben mitlaufen. Man erhielt im Vergleich von Plasma und isoliertem PC folgende Ergebnisse (siehe Tab. 7):

1. Kein Unterschied war zu erkennen bei PC und Plasma bezüglich

der Menge an nichtreagiertem PC im Überstand nach der Clot-Reaktion (E 1), wobei bei einem Versuch keine Werte vorlagen.
2. In allen Fällen ließ sich das PC nicht durch 0,4 M EDTA-Lösung aus dem Clot herauslösen (E 2).
3. Beim Löslichkeitstest mit DTT wurden bei zwei Versuchen für PC dem Plasma entsprechende Werte erreicht. Bei einem Versuch schien nach den erhaltenen Werten keine Clot-Reaktion stattgefunden zu haben. Dieses Ergebnis läßt sich höchstwahrscheinlich auf die niedrige PC-Konzentration im Reaktionsgemisch von 60 Units statt 100 Units zurückführen.
Insgesamt gesehen hatte sich das isolierte PC bei der Gerinnungsreaktion dem im Plasma enthaltenden PC entsprechend verhalten. Man konnte also folgern, daß PC durch die Behandlung bei der Isolation nicht in seiner Gerinnungsfunktion beeinträchtigt worden war.

6. Molekulargewichtsbestimmungen des nativen PC

Die elektrophoretischen Eigenschaften des PC kennzeichneten es als ein Molekül von hohem Molekulargewicht mit deutlichem Abstand zu den übrigen Haemolymph-Proteinen. In einem 5-10%igem Gel in der PAGE wanderte PC kaum ins Trenngel ein (siehe Abb. 4), in 10%igen homogenen PAA-Gelen blieb es aufgrund der geringen Porengröße sogar auf dem Gel liegen. Bei der immunelektrophoretischen Auftrennung befand sich das PC-Präzipitat nahe am Antigenloch (siehe Abb. 3, 6), wobei in diesem Fall natürlich noch die Ladung des PC eine große Rolle spielte.

Tab. 7

Reaktionsversuch mit PC

Bei den Kontrollen wurde nur Tris-HCL mit den Haemocyten kombiniert.

Nr.	Probe, die mit Haemocyten kombiniert wurde	PC-Geh. im Reaktions-gemisch (Units)	E1: PC-Geh. im Überstand (Units)	E2: PC-Geh. in d. Wasch-lösung (Units)	E3: Clot:Vol-Zunahme nach DTT-Behandlg.
1	PC (präzip.) (in 0.05 M Tris-HCL)	100	7.5	< 1	1.4
	Plasma (in 0.05 M Tris-HCL)	100	3.8	< 1	1.6
	Plasma (in 0.2 M Tris-HCL)	100	6.7	2.4	1.2
	Kontrolle (0.2 M Tris-HCL)	---	---	---	0.6
2	PC (dissoz.) (in 0.05 M Tris-HCL)	100	kein Wert	1.2	1.5
	Plasma (in 0.2 M Tris-HCL)	100	kein Wert	0.5	2.0
	Kontrolle (0.2 M Tris-HCL)	---	---	---	0.25
3	PC (dissoz.) (in 0.05 M Tris-HCL)	60	11.4	2.1	0.24
	Plasma (in 0.2 M Tris-HCL)	60	13.5	1.4	0.25
	Kontrolle (0.2 M Tris-HCL)	---	---	---	0.13

a. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der PAGE

Eine erste Abschätzung des Molekulargewichts wurde mit Hilfe der PAGE vorgenommen. In einem Plattengel mit linearem Gel- Gradienten von 5-10% PAA-Konzentration erfolgt die Auftrennung hauptsächlich nach der Größe des Moleküls (die Ladung spielt hier eine untergeordnete Rolle), und solch ein Gel ist deshalb in gewissen Grenzen geeignet für die Bestimmung von Protein-Molekulargewichten. Der Logarithmus des Molekulargewichts, aufgetragen gegen die Wanderungsstrecke im PAA-Gel, ergibt bei nativen globulären Molekülen einen linearen Zusammenhang. Mit Hilfe parallel laufender Markerproteine kann so das Molekulargewicht eines unbekannten Proteins bestimmt werden.

Mit isoliertem PC aus unterschiedlichen Präparationen nach dem Assoziation-Dissoziations-Verfahren und mit verschiedenen Markerproteinen wurden sechs unabhängige Läufe durchgeführt, wobei sich ein Molekulargewicht von 600 000 $\pm$ 50 000 für PC ergab. Abb. 10 zeigt eine dieser Molekulargewichtsbestimmungen. In diesem Fall erhielt man für PC einen Wert von 600 000.

b. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelchromatographie

Die Säulengelchromatographie stellt eine weitere relativ einfache Methode dar, unbekannte Molekulargewichte zu bestimmen. Die Säule wurde dazu mit Markerproteinen kalibriert. Trug man die Verteilungskoeffizienten K_{av} der Proteine gegen den Logarithmus der Molekulargewichte auf, so ergab sich eine Eichkurve, aus der man das Molekulargewicht von PC bestimmen konnte. Bei sechs verschiedenen Läufen mit PC aus unterschiedlichen Präparationen, ebenfalls aus dem Assoziation-Dissoziations-Verfahren, ließ sich ein Wert von 530 000 $\pm$ 50 000 für PC ablesen.

Abb. 11 zeigt einen dieser Läufe, bei dem sich ein Molekulargewicht von 500 000 für PC ergab.

Abb. 10

Molekulargewichtsbestimmung von gereinigtem dissoziierten PC in der PAGE in einem 5 - 10 %igen Gradientengel.

Eichproteine: **A** Rinderserumalbumin (68 000); **B** Catalase (230 000); **C** Ferritin (440 000); **D** Thyroglobulin (660 000)

Für **PC** wurde ein Molekulargewicht von **600 000** bestimmt.

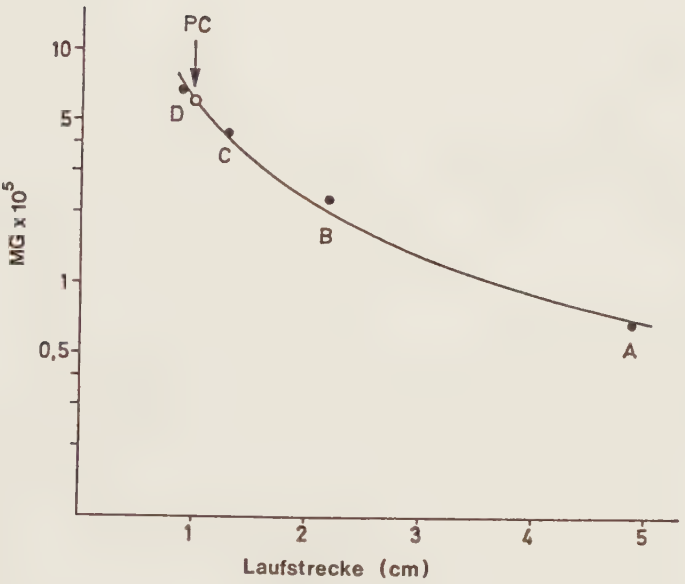
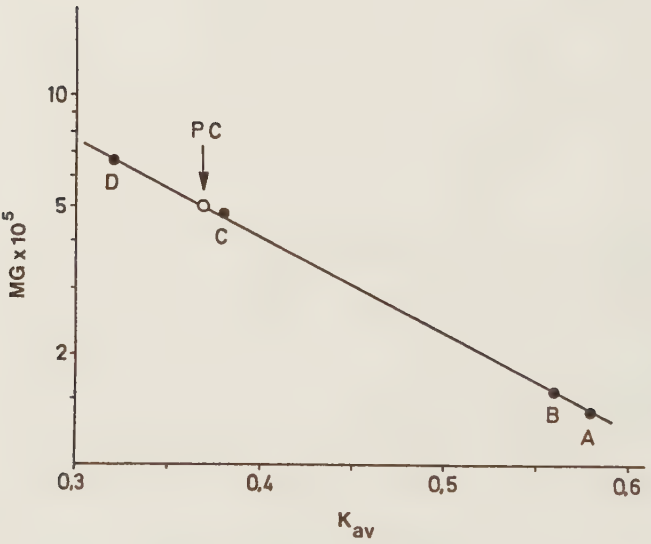


Abb. 11

Molekulargewichtsbestimmung von gereinigtem dissoziierten PC mit Hilfe der Gelfiltration in einer Ultrogel AcA 22 Säule (1.6 x 86 cm).

Eichproteine: **A** Lactatdehydrogenase (140 000); **B** Aldolase (160 000); **C** Urease (480 000); **D** Thyroglobulin (660 000).

Für PC wurde ein Molekulargewicht von 500 000 bestimmt.



Die Dünnschichtgelfiltration (DGC), die auf dem gleichen Prinzip beruht wie die Säulengelfiltration, wurde ebenfalls, da sie ein einfaches und schnelles Verfahren darstellt, zur Molekulargewichtsbestimmung des nativen PC herangezogen. Aus zwei Läufen ergab sich für dissoziiertes PC ein Wert von 480 000 ± 30 000 (siehe Abb. 12).

c. Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge

Da alle bisher angewandten Methoden zur Bestimmung eines so hohen Molekulargewichts relativ ungenau waren (Werte von 450 000 - 650 000), wurde eine zusätzliche Methode, die der Gleichgewichtszentrifugation in der Ultrazentrifuge, angewandt. Diese Methode ergibt sehr genaue Werte, vorausgesetzt, das partielle spezifische Volumen ($\bar{V}$) des zu untersuchenden Proteins ist bekannt.

Da inzwischen das PC-Protein, das nach der Präzipitations-Methode isoliert worden war, hinsichtlich seiner Aminosäure-Zusammensetzung (siehe Punkt 11) und seines Lipid- und Proteingehaltes (siehe Punkt 9) genauer untersucht worden war, war es möglich, das $\bar{V}$ rechnerisch relativ genau mit $\bar{V}$ = 0,896 zu ermitteln. Dabei wurden die $\bar{V}$ der einzelnen Aminosäuren berechnet (Cohn and Edsall, 1950), bzw. im Fall der Lipidanteile von anderen Autoren übernommen (Chino et al., 1969).

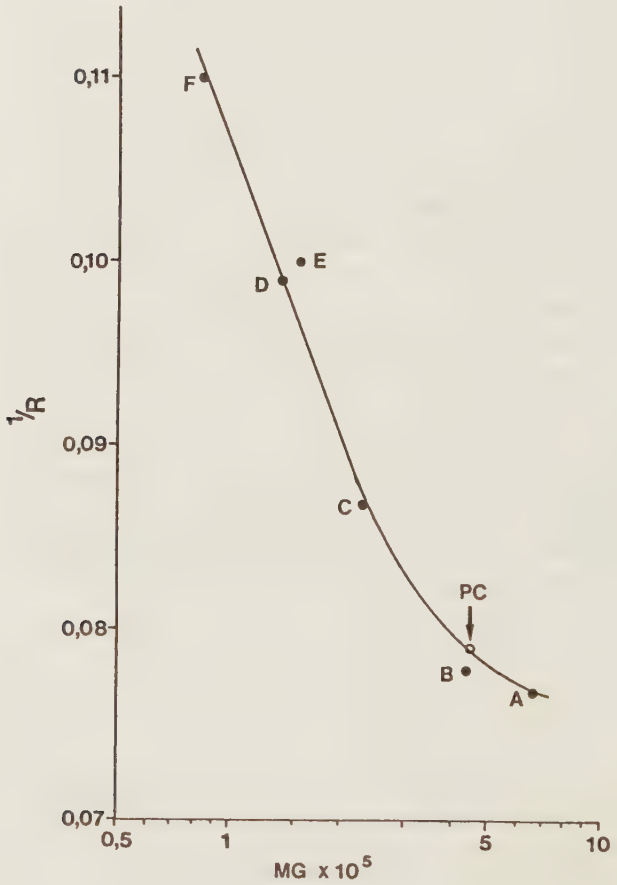
Mit Hilfe der Methode des Sedimentationsgleichgewichtslaufes nach Yphantis (1960; 1964) wurde ein Molekulargewicht von 640 000 für präzipitiertes PC bestimmt. Angesichts der relativ genauen Bestimmungsmethode dürfte dieser Wert dem wahren Molekulargewicht am nähesten kommen.

Abb. 12

Molekulargewichtsbestimmung von gereinigtem dissoziierten PC mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

Die Platte war mit Sephadex G 200 Superfine Gel beschichtet.
Eichproteine: **A** Thyroglobulin (660000); **B** Ferritin (440 000); **C** Catalase (230 000); **D** Lactatdehydrogenase (140 000); **E** Aldolase (160 000); **F** Conalbumin (86 000)

Für PC wurde ein Molekulargewicht von 450 000 bestimmt.



7. Dissoziation des PC in seine Untereinheiten

Die Molekulargewichtsbestimmungen des PC ergaben einen relativ hohen Wert von etwa 600 000. Moleküle dieser Größenordnung bestehen selten aus nur einer Polypeptidkette, in den meisten Fällen sind sie aus Untereinheiten zusammengesetzt, was vermutlich auch beim PC der Fall sein dürfte. Die folgenden Untersuchungen befaßten sich deshalb mit der Aufklärung der Struktur der Untereinheiten des PC. Falls PC aus mehreren Polypeptidketten bestehen würde, die nicht kovalent verknüpft wären, müßte man es mit Hilfe von SDS in seine Untereinheiten zerlegen können.
Die Auftrennung des mit SDS behandelten Proteins in der SDS-PAGE ließ zwei Untereinheiten PC 1 und PC 2 erkennen (siehe Abb. 13), und zwar für PC, das nach beiden Methoden isoliert worden war.
Der Verdacht, daß die höhermolekulare Bande (PC 1) eventuell aggregiertes PC 2 darstellt, konnte durch folgenden Versuch ausgeräumt werden:
Die PC 1- und die PC 2- Banden wurden durch Homogenisieren des PAA- Gels in SDS- Tris-HCl zum großen Teil aus dem Gel herausgelöst, noch einmal mit SDS behandelt und erneut in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Banden erschienen an denselben Stellen wie vorher.
Es bestand auch noch die Möglichkeit, daß weitere Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken stabilisiert sein könnten, welche durch die SDS-Behandlung nicht angegriffen würden, am Aufbau des Moleküls beteiligt sind. Aus diesem Grunde wurde PC vor der SDS-PAGE auch mit reduzierenden Reagentien wie Mercaptoäthanol und DTT behandelt. Es war kein Unterschied im Bandenmuster zu erkennen. Das bedeutete, Disulfidbindungen sind nicht am Aufbau der Quartärstruktur beteiligt.
Die Frage, in welchem Mol-Verhältnis PC 1 und PC 2 im nativen Molekül vorliegen, konnte nicht befriedigend geklärt werden. Die densitometrische Auswertung mehrerer Läufe brachte keine eindeutigen Ergebnisse. Dabei wurden die Kurven, die sich bei der Mes-

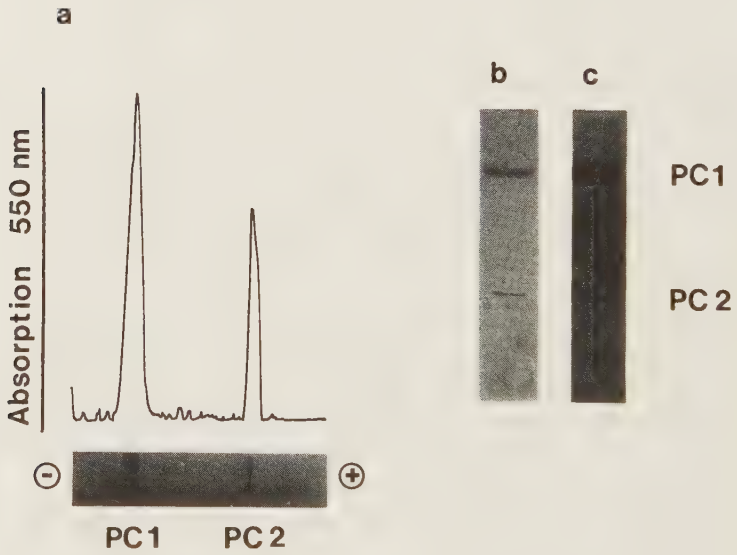
Abb. 13

Dissoziation von gereinigtem **PC** in die Untereinheiten **PC 1** und **PC 2** mit Hilfe von SDS-PAGE in 5 - 10 %igen Gradientengelen.

a, b **PC** nach dem Präzipitations-Verfahren isoliert.

a Oberer Teil der Abb. : Densitometerkurve.

c **PC** nach dem Assoziation-Dissoziations Verfahren isoliert.



sung der Extinktion bei 550 nm ergaben (siehe Abb. 13a), ausgeschnitten, gewogen und aus den Gewichten die molaren Verhältnisse von PC 1 : PC 2 unter Berücksichtigung ihrer Molekulargewichte (siehe Punkt 8) bestimmt. Bei 17 Messungen ergab sich ein Wert von PC 1 / PC 2 = 1,7 ($\pm$0,17), was bedeuten würde, daß etwa zwei PC 2-Polypeptidketten mit einer PC 1-Polypeptidkette verknüpft wären.
Da das molare Verhälnis der Untereinheiten aus der Anfärbbarkeit der Gele mit Coomassie Brilliant Blue nicht genau bestimmt werden kann, sind diese Ergebnisse nicht aussagekräftig!

8. Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptidketten in der SDS-PAGE

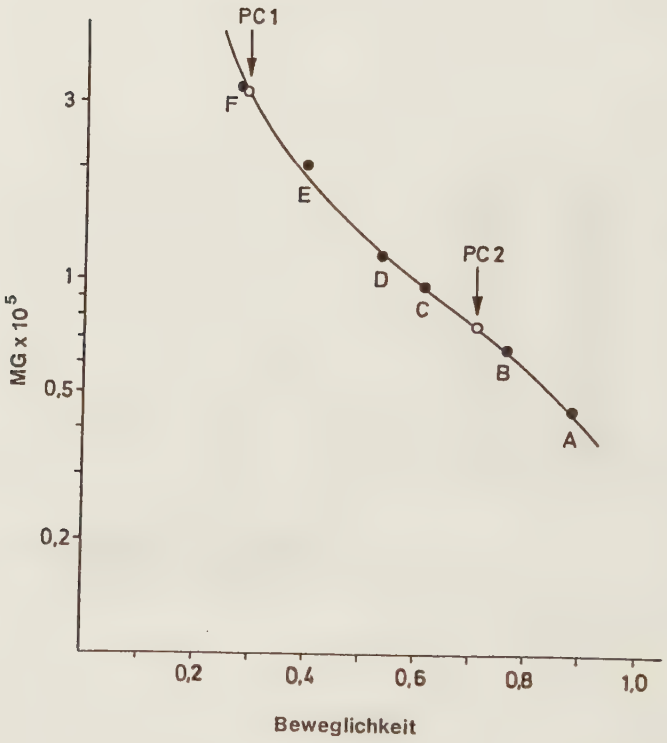
Mit Hilfe der SDS-PAGE ist es möglich, nicht nur die Anzahl, sondern auch die Größe der Untereinheiten eines Proteins zu bestimmen. Durch gleichzeitiges Auftrennen von Markerproteinen und PC konnte das Molekulargewicht der zwei Untereinheiten von PC, das nach dem Präzipitations-Verfahren isoliert worden war, bestimmt werden (Abb. 14). Die schwere Bande, PC 1, hatte ein Molekulargewicht von 320 000, die leichte Bande, PC 2, von 76 000. Es wurden mehrere Elektrophoresen sowohl mit verschiedenen PC-Präparationen aus beiden Isolationsverfahren, als auch mit verschieden konzentrierten Gelen (5%ige homogene Gele und 5-10%ige Gradientengele) durchgeführt. Dabei trat kein wesentlicher Unterschied (Abweichung von $\pm$ 10 000 bei PC 1 und $\pm$5 000 bei PC 2) bei den Werten auf.
Wie die Untersuchung der Untereinheiten-Struktur ergab, stellte PC also ein Heteropolymer mit zwei verschiedenen Größenklassen von Untereinheiten dar.

Abb. 14

Molekulargewichtsbestimmung der PC-Untereinheiten PC 1 und PC 2 in der SDS-PAGE in einem 5 - 10 %igen Gradientengel.

Eichproteine: **A** Albumin (egg) (45 000); **B** Rinderserumalbumin (68 000); **C** Phosphorylase B (98 000); **D** ß-Galaktosidase (116 000); **E** Myosin (200 000); **F** Thyroglobulin (330 000)

Für **PC 1** wurde ein Molekulargewicht von **320 000** und für **PC 2** von **76 000** bestimmt.



9. Die Lipid- und Kohlenhydratbestandteile des PC

Es gab mehrere Hinweise auf einen beträchtlichen Lipidanteil im PC-Molekül. Zum einen deuteten spezifische Lipidfärbungen in der Immunelektrophorese (Abb. 3c) und in der PAGE (Abb. 4c) darauf hin, zum anderen zeigte das Sedimentationsverhalten von PC in der Ultrazentrifuge einen für solch ein großes Molekül erstaunlich kleinen Wert von s_{app} = 7,7. Da der Sedimentationskoeffizient eine Funktion des Gewichts und der Gestalt eines Partikels ist, wäre dieser kleine Sedimentationskoeffizient für PC erklärbar mit einem hohen Lipidanteil, der die Dichte und damit die Gestalt des Moleküls im Vergleich zu einem 'Normalprotein' verändern würde.
Die nächsten Versuche beschäftigten sich mit der Lipidextraktion von isoliertem PC, wobei PC aus beiden Isolationsverfahren eingesetzt wurde. Dabei stellte sich das Problem, eine für die Extraktion genügend große und stark konzentrierte Menge von isoliertem gereinigtem PC zu erhalten.
Die Methode von Folch et al. (1957) erwies sich in unserem Fall für die Lipidextraktion am geeignetsten, wobei eine abgewandelte ähnliche Methode (nach Stratakis, persönliche Mitteilung) ebenfalls angewandt wurde.
Die gravimetrische Bestimmung des Gesamt-Lipids ergab einen Wert von 50,3% (siehe Tab. 8). Das Apoprotein, welches ebenfalls gravimetrisch bestimmt wurde, hatte einen Anteil von 49,3% am Gewicht des Gesamt-Moleküls.
Die einzelnen Lipidbestandteile wurden , soweit wie möglich, sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) gelang die Auftrennung der neutralen Lipide in Triglyceride, Diglyceride, freie Fettsäuren und andere Bestandteile, die nicht näher identifiziert wurden, aber wahrscheinlich aufgrund ihrer Lage Ester und Kohlenwasserstoffe darstellten (Abb. 15b). Die quantitative Bestimmung zeigte, daß Diacylglycerol mit 18,7% den Hauptanteil an den neutralen Lipiden stellte (Tab. 8). Cholesterin war, entgegen unserer anfänglichen

Tab. 8

Lipid-Zusammensetzung von PC

Die Lipide wurden extrahiert und bestimmt, wie schon in Material und Methoden beschrieben. Die Fraktionen 1-7 sind in Prozent vom Gesamt-Lipidgehalt angegeben.

Bestandteil	Gewicht (%)
Protein	49.7
Gesamt-Lipide	50.3 ± 1.6 (3)[1]
1. Triacylglycerol	5.1 ± 2.6 (5)
2. Diacylglycerol	18.7 ± 5.1 (5)
3. Monoacylglycerol	0
4. Cholesterin	0
5. Freie Fettsäuren	11.6 ± 4.4 (5)
6. Nicht identifiziert	26.4 ± 6.6 (5)
7. Gesamt-Phospholipide (PE / PCH / PI)[2]	33.1 ± 4.0 (5) (2.2 / 1.7 / 1.0)[3]
8. Summe von 1-7	94.9

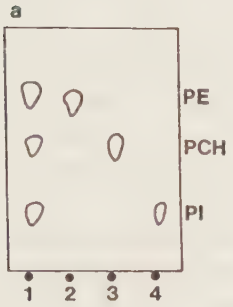
[1] Standardabweichung; Anzahl der Bestimmungen in Klammern

[2] PE = Phosphatidylethanolamin; PCH = Phosphatidylcholin; PI = Phosphatidyl Inositol

[3] Mol-Verhältnis

Abb. 15

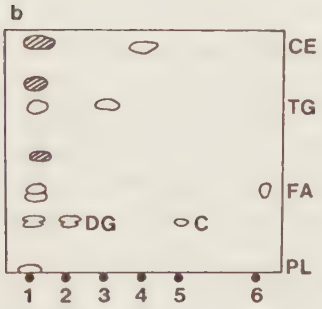
Schematische Darstellung der Dünnschichtchromatographie von PC-Lipiden auf Silika-Gel Platten.



a Identifizierung der Phospholipide

Die Lipide wurden mit Molybdän Blau und mit Ninhydrin sichtbar gemacht.
1 Phospolipide von PC

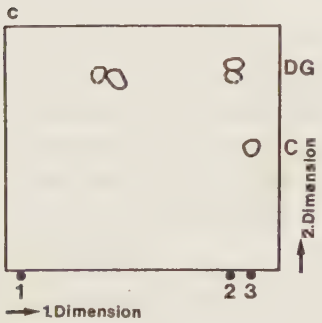
Referenzlipide:
2 Phosphatidylethanolamin (PE)
3 Phosphatidylcholin (PCH)
4 Phosphatidyl Inositol (PI)



b Identifizierung der Gesamt-Lipide

Die Lipide wurden mit Phosphormolybdänsäure sichtbar gemacht.
1 Gesamt-Lipide von PC, PL=Phospholipide (bleiben am Auftragspunkt liegen); schraffierte Flecken bezeichnen die nicht identifizierten Lipidanteile.

Referenzlipide:
2 Diglycerid (DG)
3 Triglycerid (TG)
4 Cholesterol Ester (CE)
5 Cholesterin (C)
6 Freie Fettsäure (FA)



c Identifizierung der PC-Diglyceride durch zweidimensionale Dünnschichtgelchromatographie.

Die Lipide wurden mit Phosphormolybdänsäure sichtbar gemacht.
In der 1. Dimension wurde nur die PC-Diglycerid-Fraktion aufgetrennt; in der 2. Dimension auch die Referenzlipide
1 PC-Diglycerid-Fraktion

Referenzlipide:
2 Diolein (DG=Diglycerid)
3 Cholesterin (C)

Vermutung, nicht vertreten. Mit Hilfe eines Lösungsmittels nach Freeman and West (1966) ließen sich Cholesterin und Diglyceride, die in dem normalerweise verwendeten Lösungsmittel die gleiche Laufstrecke hatten, gut voneinander trennen. Die parallel laufende PC-Diglycerid-Probe hatte die gleiche Laufstrecke wie das Standard-Diglycerid (Abb. 15c).
Neben den neutralen Lipiden wurde ein relativ hoher Phospholipidanteil von 33,1% ermittelt (Tab. 8). Die weitere Auftrennung der Phospholipide ließ drei verschiedene Typen erkennen: Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PCH) und Phosphatidyl Inositol (PI) (Abb. 15a).
Die quantitative Bestimmung gestaltete sich aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Material etwas schwierig. Eindeutig ließ sich nur das mengenmäßige Verhältnis der drei Phospholipide zueinander bestimmen: PE/PCH/PI = 2,2:1,7:1,0 (Tab. 8).

Färbeversuche auf Kohlenhydrate mit dem PAS-Reagens von PC in der PAGE deuteten auch auf einen geringen Kohlenhydratanteil im nativen Molekül hin. Mit Hilfe der photometrischen Anthron- Methode, wobei Glukose als Standard diente, wurde ein Kohlenhydratanteil von etwa 0,8% bestimmt. Es wurde dabei dissoziiertes PC eingesetzt.

10. Mengenmäßiger Anteil des PC am Gesamtplasma

Da die chemische Zusammensetzung des Moleküls annähernd bestimmt worden war, konnte man versuchen, den Anteil dieses Gerinnungsproteins am Gesamt-Plasma zu bestimmen.
In unserem Testsystem war es nur möglich gewesen, den relativen Anteil von PC im Plasma mit Hilfe der Radialimmundiffusion zu bestimmen, ausgedrückt in Units. Durch einen Vergleich von isoliertem PC und Plasma in der Radialimmundiffusion und durch Proteinbestimmung (Lowry und Biuret) konnte diesem relativen Wert ein absoluter Wert zugeordnet werden. 100 Units entsprachen etwa ei-

ner PC-Konzentration von 3,5 mg/ml. Durch den Vergleich verschieden konzentrierter Plasma-Präparationen in 0,05 M Tris-HCl als auch in 0,2 M Tris-HCl in der Radialimmundiffusion mit dem entsprechenden PC- Wert (3,5 mg/ml entsprechen 100 Units) ergaben sich beträchtliche Unterschiede, den PC-Anteil am Gesamt-Plasma betreffend: Werte um 10% PC-Anteil am Plasma zeigte in der Regel Plasma, welches in 0,2 M Tris-HCl gelöst war und Werte um 6% PC-Anteil zeigte Plasma, welches in 0,05 M Tris-HCl vorlag. Eine genaue Bestimmung des PC-Anteils war also nicht möglich. Diese Schwierigkeiten waren aber aufgrund der Präparationsmethode und des bisher beobachteten Verhaltens von PC-Lösungen vorauszusehen gewesen. Da beim Entbluten der Tiere zur Gewinnung des Plasmas die Haemolymphe in jedem Fall mit EDTA-Medium verdünnt werden mußte, schied die Möglichkeit aus, die Protein- und damit auch die PC -Konzentration im Plasma dem nativen Zustand entsprechend zu berechnen. Unsere Messungen konnten sich nur auf Plasma, das schon in vielfältiger Weise manipuliert worden war (Verdünnen mit EDTA-Medium, Dialyse, Einfrieren-Auftauen, Konzentrieren), beziehen. Wie die Erfahrung zeigte, war aber gerade PC sehr empfindlich gegenüber Puffern niedriger Ionenstärke und gegenüber Einfrier-Vorgängen, indem es irreversibel aggregierte. So gesehen war der erheblich niedrigere Wert des PC-Anteils am Plasma in 0,05 M Tris-HCl nicht verwunderlich. Da man annehmen mußte, daß auch ein Teil des PC in höhermolaren Puffern ausfiel, stellt der Wert von 10% PC-Anteil eine untere Grenze dar, wahrscheinlicher ist ein Anteil bis 15% oder sogar darüber. Bei der Berechnung war bisher allerdings nur der Proteinanteil berücksichtigt worden. Falls man den Gesamtanteil, das heißt Protein- und Lipidanteil von PC am Plasma bestimmen wollte, mußte der 50%ige Lipidanteil im PC bei der Berechnung berücksichtigt werden. Geht man davon aus, daß der Lipidgehalt der übrigen Haemolymph-Proteine, wenn überhaupt vorhanden, zu vernachlässigen sei, so erhöht sich der wahrscheinliche Gewichtsanteil des Gesamt-PC am Plasma auf 20-30%. Dieser Wert, so muß noch einmal betont werden, beruht jedoch

nicht auf exakten Berechnungen, sondern schließt notgedrungen Annahmen mit ein.

11. Aminosäureanalyse von PC

Eine genauere Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens ($\bar{V}$) setzte eine Aminosäureanalyse des nativen PC voraus. Zum Vergleich von PC mit Plasma-Lipoproteinen anderer Insekten war diese Analyse ebenfalls erforderlich. In Tab. 9 ist das Ergebnis dieser Analyse für präzipitiertes PC aufgelistet, zusammen mit Werten von drei weiteren Insekten-Lipoproteinen. Wie man aus der Tabelle ersieht, sind die Werte bei allen Proteinen, von kleineren Unterschieden abgesehen, recht ähnlich. Der Gehalt an Asparagin/Asparaginsäure, an Glutamin/Glutaminsäure sowie an Valin und Leucin ist relativ hoch. Der Methionin-Gehalt ist in allen Fällen extrem gering oder Methionin ist nicht vorhanden.
Bei den Werten von Leucophaea ist noch zu beachten, daß in diesem Fall nicht auf den Hydrolysezeitpunkt 0 extrapoliert wurde und deshalb die Threonin-, Serin- und Tyrosin- Daten eventuell nicht genau sind, ebenso die Valin- und Isoleucin- Daten, die man durch Extrapolation auf den Hydrolysezeitpunkt unendlich hätte korrigieren müssen. Ein Peak, der etwa der Größe von Alanin entsprach, konnte nicht identifiziert werden. Er könnte vermutlich einem Aminozucker oder dem Amin des Phosphatidylethanolamins (Lipid wurde vor der Hydrolyse nicht abgetrennt) entsprechen.

Tab. 9

Aminosäureanalyse von PC

Zum Vergleich sind die Werte der Lipophorine (DGLPs) von drei anderen Insekten mit aufgeführt.
Die angegebenen Werte von PC sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Aminosäure	Mol / 1000 Mol			
	PC	Lipophorin[1] (cockroach)	Lipophorin[2] (locust)	Lipophorin[3] (silkworm)
Asp	**123**	110	114 (119)	126
Thr	**74**	66	60 (55)	49
Ser	**87**	69	71 (76)	69
Glu	**83**	108	112 (120)	104
Pro	**nb**[4]	38	38 (51)	47
Gly	**90**	64	63 (62)	67
Ala	**85**	68	72 (70)	63
Val	**104**	84	84 (70)	74
Met	**-**	3	2 (-)	5
Ile	**29**	41	42 (51)	58
Leu	**107**	107	106 (96)	90
Tyr	**18**	30	27 (39)	28
Phe	**75**	47	47 (47)	48
His	**46**	39	37 (19)	28
Lys	**51**	93	92 (76)	107
Arg	**32**	27	26 (39)	37

[1] Periplaneta americana (Chino et al., 1981)

[2] Locusta migratoria (Chino and Kitizawa, 1981; in Klammern Gellissen und Emmerich, 1980)

[3] Philosamia cynthia (Chino et al., 1969)

[4] nicht bestimmt

D. Diskussion

1. Blutgerinnung bei Leucophaea maderae

Erste Beobachtungen der Blutgerinnung bei Schaben mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops sind schon 1950 von Grégoire und Florkin gemacht worden (Grégoire and Florkin, 1950; Grégoire, 1953). Diese Untersuchungen und die anderer Autoren wurden später ergänzt durch elektronenmikroskopische Arbeiten (Arnold, 1974; Crossley, 1975; Franke, 1960; Grégoire, 1970; 1974; Jones, 1962). Sie befassen sich hauptsächlich mit den morphologischen Veränderungen bei der Gerinnung, biochemische Aspekte wie beteiligte Faktoren und Gerinnungsproteine, bleiben unberücksichtigt.
Die Gerinnungsvorgänge bei den Insekten lassen sich nach mikroskopischen Beobachtungen von Grégoire an mehr als 1600 Insektenarten vier verschiedenen Modellen zuordnen. Dem Typ, der am weitesten verbreitet ist, gehört auch Leucophaea maderae an. Danach sollte die Gerinnung folgendermaßen ablaufen:
Beim Kontakt mit fremden Oberflächen platzen die Coagulocyten, eine Art von sehr empfindlichen Haemocyten, und geben ihren Inhalt in die umgebende Flüssigkeit ab. Um die veränderten Zellen herum beginnt die Gerinnung des Plasmas, vermutlich durch die Einwirkung eines Enzyms aus den Haemocyten, in Form von Gerinnungsinseln granulärer Konsistenz. Diese Gerinnungsinseln entwickeln sich, je nach untersuchter Art, bis zu einer bestimmten Größe.

a. Haemocyten-Gelierung (Gel)

Nach unseren Beobachtungen scheint die erste Phase der Haemolymph- Gerinnung bei Leucophaea in der Freigabe von Granula aus den Granulocyten, einer sehr fragilen Art von Haemocyten, zu bestehen. Aus den Granula freigesetztes Material vernetzt augenblicklich zu einem weichen Gel.
Diese vermutliche Anfangsphase des nativen Gerinnungsvorgangs

konnte in vitro nachvollzogen werden, indem man die vollständig von Haemolymphbestandteilen getrennten Haemocyten zum Platzen brachte. Es bildete sich unter starker Viskositätszunahme ein Gel, das nach immunologischen Untersuchungen ein Gerinnungsprotein, HC, enthielt. Dieses Gel war relativ weich und locker. Es löste sich nicht in starken Detergentien, wie Lösungen aus 2% SDS + 4 M Harnstoff, 8 M Harnstoff, 6% Guanidin Chlorid oder 1% Triton. Zum größten Teil löslich war es jedoch in Harnstoff-Lösungen, die reduzierende Agentien wie 0.5 M DTT enthielten. Außerdem wurde es durch proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pronase aufgelöst. Dieses Verhalten ließ im Gel eine Verknüpfung der HC-Proteine untereinander durch Disulfidbrücken vermuten. Aber die Veränderungen, die durch das Quellen und die Gel-Bildung des HC eintreten, sind bisher genauso wenig bekannt, wie die chemische Natur des HC selbst.

b. Haemolymph-Gerinnung (Clot)

Bei der Haemolymph-Gerinnung bewirken Haemolymphbestandteile ein gegenüber dem Haemocyten-Gerinnsel verändertes Gerinnungsprodukt, das Clot. Dieses Clot, das auch in vitro entsteht, wenn man Haemocyten und Plasma mischt und die Gerinnung durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen induziert, unterscheidet sich in einigen Eigenschaften vom Gel. Äußerlich fällt die festere und kompaktere Konsistenz gegenüber dem Gel auf. Eine Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften war indirekt möglich durch die Messung der Quellkapazität beider Gerinnsel, die umgekehrt proportional zum Vernetzungsgrad sein sollte. Demnach besitzt das Gel eine 8 mal so große Quellkapazität wie das Clot (Bohn et al., 1981). Durch Detergentien oder durch reduzierende Agentien kann es nicht in Lösung gebracht werden. Durch proteolytische Enzyme wird es aber entsprechend dem Gel komplett aufgelöst.

Die elektrophoretischen Untersuchungen ergaben, daß im Clot zwei ihrer Herkunft nach unterschiedliche Coagulogene verknüpft sind: HC, das Coagulogen aus den Haemocyten, welches auch ohne die

übrigen Haemolymphbestandteile ein Gel bilden kann, und PC, ein aus dem Plasma stammendes Coagulogen, welches allein nicht gerinnen kann.

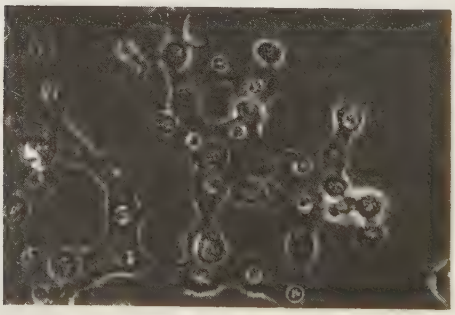
c. Ablauf der nativen Gerinnung

Aus den bisherigen Ergebnissen der Untersuchungen in unserem Labor (Barwig and Bohn, 1980; Bohn et al., 1981, Bohn and Barwig, in press) könnte man folgendes Modell der Blutgerinnung bei Leucophaea entwickeln, wobei natürlich noch etliche Fragen unbeantwortet bleiben (siehe auch Abb. 16):

Die Gerinnung kann ausgelöst werden durch mechanische Reizung der Granulocyten, einer besonders empfindlichen Art von Haemocyten. Aus den Granula dieser Zellen wird explosionsartig Material ausgestoßen. Dabei platzen die Granulocyten.

Abb. 16

Phasenkontrast-Aufnahme des Haemolymph-Gerinnsels von Leucophea maderae.



Unbekannt ist bisher, wodurch die Freisetzung des granulären Materials und die damit verbundene Desintegration der Haemocyten ausgelöst wird. Wahrscheinlich sind chemische Signale in der Haemolymphe dafür verantwortlich. Da das Platzen der Haemocyten durch Chelatbildner wie EDTA verhindert werden kann, könnten Ca^{2+}-Ionen auf der Zelloberfläche eine Rolle dabei spielen.

Die Granula setzen ein Haemocyten-Protein frei, das augenblicklich ein weiches Gel um die zerplatzten Zellen herum bildet. Diese Phase der Gerinnung wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Rowley und Ratcliffe über die Haemolymph-Gerinnung bei Galleria mellonella bestätigt (Rowley and Ratcliffe, 1976). In diesem Fall beginnt die Gerinnung mit der Veränderung der granulären Struktur der Granulocyten, der augenblicklich die Entladung von granulärem Material folgt. Diese Reaktion tritt bei Galleria auch ein, wenn Bakterien injiziert werden, wobei diese nicht wie üblich phagozitiert, sondern von granulärem Material umgeben werden.

Bei Leucophaea maderae vernetzt das von den Haemocyten gebildete Gel mit Proteinen aus dem Plasma zu einem festen Gerinnsel, dem Clot.

Es gibt bisher keinen Beweis, aber mehrere starke Hinweise für eine Interaktion von HC und PC im Clot:

1. Die immunelektrophoretischen Untersuchungen des Clot, wie auch der Vergleich von Plasma und Serum zeigen, daß PC im Clot eingebaut wird.

2. Durch Immunofluoreszenzuntersuchungen sind beide Coagulogene an exakt derselben Stelle in den Gerinnungsinseln nachweisbar (Bohn et al., 1981). Hierbei wurden Gerinnungshöfe um die Haemocyten herum gebildet, und das sich an diese Strukturen anhängende PC konnte mit spezifischen Seren dort nachgewiesen werden.

3. Das Löslichkeitsverhalten des Clot spricht für eine Interaktion von HC und PC.

Die Art der möglichen Verknüpfung zwischen diesen beiden Gerinnungsproteinen konnte bislang allerdings noch nicht geklärt wer-

den. Alles deutet auf eine kovalente Verbindung hin, wobei jedoch Disulfidbrücken aufgrund der Lösungsversuche ausscheiden.
In einem Testsystem, in dem ein Teil der nativen Gerinnung nachvollzogen und studiert werden sollte, ließ man gewaschenes Haemocyten-Gel und Plasma miteinander reagieren. In diesem Fall fand aber, entgegen anfänglichen Vermutungen, keine wirkliche Gerinnung statt. Für die Vollständigkeit einer Gerinnungsreaktion wurden mehrere Kriterien erarbeitet, die hierbei nicht erfüllt wurden. Es fand zwar eine Anlagerung von PC aus dem Plasma ans HC statt, diese Bindung war jedoch in höhermolaren Puffern reversibel. Erstaunlich war die hohe Spezifität, mit der dieses PC von allen anderen Plasma-Proteinen ans Gel assoziiert wurde. Diese hohe Spezifität ließ vermuten, daß bei der nativen Gerinnung in einem ersten Schritt vor der eigentlichen Interaktion eine ähnliche Assoziation stattfinden könnte, diese spezifische Assoziation von HC und PC also eine Vorstufe der endgültigen Gerinnungsreaktion darstellt. Die Art der Bindung zwischen HC und PC bei dieser Assoziation ist bisher ebenfalls nicht bekannt. Die Tatsache, daß diese Zusammenlagerung nur bei niedrigen Ionenstärken und bei neutralem pH stattfinden kann, bei höheren Ionenstärken oder stärker alkalischem pH die beiden Gerinnungsproteine aber wieder dissoziieren, scheint darauf hinzuweisen, daß die Ladungen der beteiligten Proteine eine wesentliche Rolle bei der Assoziation spielen. Möglicherweise sind elektrostatische Bindungskräfte beteiligt.
Mischt man statt Gel intakte, von den übrigen Haemolymphbestandteilen isolierte Haemocyten mit Plasma und löst durch wiederholtes Einfrieren-Auftauen Gerinnung aus, so entsteht, vorausgesetzt Ca^{2+}-Ionen sind anwesend, ein dem natürlichen Gerinnsel entsprechendes Reaktionsprodukt, das Clot. HC in Form von Haemocyten-Gel ist nicht mehr in der Lage, mit PC solch ein festes Gerinnsel zu bilden. Da das Gel vor der Reaktion gewaschen wurde, wäre es denkbar, daß ein löslicher Faktor, der die Vollständigkeit der Gerinnungsreaktion bewirkt, ausgewaschen worden wäre. Die Exis-

tenz solch eines löslichen Faktors im Überstand nach Abzentrifugieren des Gels schien nach weiteren Versuchen unwahrscheinlich. Vermutlich kann das Haemocyten-Gel aufgrund eines Alterungsprozesses, dem das HC im Verlauf der Gelbildung unterworfen ist, nicht mit PC zum Clot reagieren. Im Haemocyten-Gel scheint dieser Faktor durch Einfrier-Auftau- und Zentrifugations-Vorgänge schon inaktiviert zu sein. Das heißt, der Zeitraum, in dem ein aus den Granula freigesetzter Faktor mit dem PC in Verbindung treten kann, spielt eine wesentliche Rolle bei der Vollständigkeit der Gerinnung. Wir bezeichneten diesen Vorgang mit Alterung. Der Faktor ist höchstwahrscheinlich mit dem HC identisch, und die Inaktivierung des HC im gealterten Gel könnte man mit der Umwandlung von SH -Gruppen in Disulfidbindungen erklären (Bohn and Barwig, in press). Die Stabilisierung eines Großteils des Gels durch Disulfidbrücken war durch verschiedene Lösungsversuche schon bestätigt worden.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen über die Beteiligung von Enzymen an der Gerinnungsreaktion konnte die Existenz eines SH-Faktors in den Haemocyten, dessen Hemmung mit SH-Reagentien die Gerinnung verhinderte, nachgewiesen werden (Bohn and Barwig, in press). Die Frage, inwieweit dieser Faktor ein Enzym, zum Beispiel ein Cystein-Enzym darstellt, das entsprechend einer Transglutaminase die kovalente Verknüpfung beider Coagulogene katalysiert, oder ob HC selbst mit diesem Faktor identisch ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Sicher ist, daß Ca^{2+}-Ionen für diesen Prozeß notwendig sind. Das heißt, bei der Blutgerinnung von Leucophaea sind an mindestens zwei verschiedenen Vorgängen Ca^{2+}-Ionen beteiligt: beim Platzen der Granula und bei der Interaktion beider Gerinnungsproteine.

2. Vergleich der Gerinnungsmechanismen innerhalb der Arthropoden

Man könnte vermuten, daß die Verknüpfung zweier unterschiedlicher Proteine zu einem Gerinnsel, wie bei der Blutgerinnung von Leucophaea maderae nachgewiesen, ein Prinzip darstellt, das bei den Arthropoden weiter verbreitet ist.
Bisher sind Crustaceen und Xiphosuren, was die Blutgerinnung betrifft, am intensivsten von allen Arthropoden untersucht worden. Sie stellen zwei Extreme dar, denn bei den ursprünglichsten Vertretern der Arthropoden, bei Limulus und Verwandten, sind nur Haemocytenbestandteile, bei den Crustaceen dagegen in der Hauptsache Plasmabestandteile an der Gerinnung beteiligt.
Leider war es bisher nicht möglich, bei den Crustaceen ein einheitliches Bild der Gerinnung zu zeigen, nicht zuletzt aufgrund widersprüchlicher Angaben über die Beteiligung von Haemocyten-und Plasma-Faktoren.

a. Gerinnung bei den Crustaceen

In den letzten Jahren wurde, besonders auch im Vergleich mit den Vertebraten, die Crustaceen-Blutgerinnung ausgiebig untersucht.
Die am häufigsten vertretende Hypothese, für einige Vertreter der Crustaceen wie Panulirus (Doolittle and Fuller, 1972; Fuller and Doolittle, 1971), Astacus (Durliat and Vranckx, 1976) und Homarus (Durliat and Vranckx, 1981; Lorand, 1972; Stewart et al., 1966) nachgewiesen, besagt, daß ein in seiner Funktion dem Vertebraten-Fibrinogen ähnliches gelöstes Plasma-Protein beim Gerinnungsprozeß, ohne vorherige Proteolyse, durch eine aus den Haemocyten stammende Transglutaminase, in diesem Fall eine Lysyl-Glutamyl-Transpeptidase, auch Fibrinoligase genannt, kovalent verknüpft wird. Die Haemocyten steuern das Enzym, das die kovalente Bindung katalysiert, bei. Das Gerinnsel selbst besteht nur aus einem Protein, wobei die Frage nach dem Ursprung dieses Proteins noch nicht geklärt ist. Manche Autoren behaupten, die Synthese des Monomers fände in den Haemocyten statt. Als Dimer würde es dann

in die Haemolymphe entlassen (Bauchau and Mengeot, 1978; Durliat and Vranckx, 1976). Weiterhin ist die Rolle der Haemocyten-Faktoren bei der Gerinnung noch ungeklärt. Durliat and Vranckx (1981); Söderhäll (1981) und Mengeot et al. (1977) nehmen an, daß Gerinnungsvorgänge auch ohne Plasma, nur mit Haemocytenmaterial stattfinden können. Auch die Meinung, daß das Gerinnungsprotein während der Gerinnung nicht aus dem Plasma, sondern aus den Haemocyten freigegeben wird, wird von einigen Autoren vertreten (Bauchau and De Bouwer, 1974; Clark, 1971; Stutman and Dolliver, 1968).

Diese kontroversen Ergebnisse kommen sicherlich unter anderem auch durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zustande und durch die Unterschiede, die bei den verschiedenen untersuchten Arten auftreten können.

Zur Klärung dieser Fragen werden in unserem Labor an Astacus Versuche zur Blutgerinnung unternommen. Nach den bisherigen Ergebnissen, unter anderem von Arja Miettinen-Baumann in ihrer Diplomarbeit (1984) erarbeitet, sieht es so aus, daß bei Astacus neben dem Plasma-Coagulogen auch ein Haemocyten-Coagulogen in die Gerinnungshöfe um die Haemocyten eingebaut wird. Außerdem scheint das Plasma-Coagulogen nicht in den Haemocyten enthalten zu sein. Bei Locusta zum Beispiel findet die Synthese des Lipophorin nicht in den Haemocyten, sondern im Fettkörper statt, wie Gellissen und Wyatt (1981) nachweisen konnten. Auch bei Leucophaea scheint PC im Fettkörper synthetisiert zu werden.

Gewisse Ähnlichkeiten in der Blutgerinnung wären nach diesen Untersuchungen zwischen den Blattaria und einigen Vertretern der Crustaceen durchaus denkbar, wobei die Bedeutung von Haemocyten- und Plasma-Faktoren natürlich schwanken könnte.

Der Gerinnungsvorgang bei den Crustaceen scheint wiederum einem Gerinnungsschritt bei den Vertebraten sehr ähnlich zu sein. Bei den Vertebraten besteht die zentrale Reaktion beim Gerinnungsprozeß, einem komplizierten, enzymatisch gesteuerten Vorgang, in der Umwandlung des löslichen Plasma-Proteins Fibrinogen in das unlös-

liche Fibrin, welches das Gerüst des Blutgerinnsels bildet. Der erste Schritt hierbei stellt eine begrenzte Proteolyse des Fibrinogens dar, wobei die entstehenden Fibrin-Monomere reversibel zum Fibrin polymerisieren. Als zweiter Schritt folgt dann die kovalente Verknüpfung dieser Fibrinuntereinheiten zum stabilen Fibrin-Gel durch die Katalyse eines Ca^{2+}-abhängigen Enzyms, einer Transglutaminase, auch als Faktor XIII bezeichnet. Dieser zweite Schritt, die Verknüpfung von Fibrinuntereinheiten über Lysin-Glutamin - Seitenketten mit Hilfe einer Transglutaminase vom SH-Typ, entspricht den Gerinnungsvorgängen bei den Crustaceen. Sowohl die Art der Bindung, als auch das beteiligte Enzym stimmen überein.

Ghidalia und Mitarbeiter konnten sogar nachweisen, daß Crustaceen-Fibrinoligase und menschliche Fibrinoligase (Faktor XIII) in ihrer Funktion austauschbar sind (Ghidalia et al., 1982). Crustaceen-Fibrinoligase konnte die Amidbindung von menschlichen Fibrin-Monomeren induzieren, wie auch Faktor XIII die Gerinnung von Crustaceen-Fibrinogen induzieren konnte.

Im Vergleich zu unseren Untersuchungen mit Leucophaea läßt sich folgendes sagen: Im Unterschied zu den Crustaceen werden bei Leucophaea zwei verschiedene Proteine miteinander verknüpft. Eines der beiden Proteine stellt auch ein Plasma-Gerinnungsprotein dar. Durchaus denkbar wäre bei Leucophaea, wie bei den Crustaceen und bei den Vertebraten, eine Katalyse dieser Interaktion durch ein Ca^{2+}-abhängiges Enzym, eventuell auch einer Lysyl-Glutamyl-Transpeptidase vom SH-Typ.

b. Gerinnung bei den Xiphosuren

Nicht nur bei den Crustaceen, sondern auch bei Limulus und Verwandten, den Xiphosuren, ist der Gerinnungsprozeß genauer untersucht worden. Hier stammt das gerinnungsfähige Protein, das Coagulogen, nicht, wie bei den Vertebraten, aus dem Plasma, sondern aus den Haemocyten, aus deren Granula es bei der Gerinnung freigesetzt wird. Alle an der Gerinnung beteiligten Faktoren scheinen

in den Haemocyten enthalten zu sein. Nach Untersuchungen, vor allem von Ohki (Ohki et al., 1980) und Nakamura (Nakamura and Levin, 1982) durchgeführt, läuft der Gerinnungsprozeß bei den Xiphosuren in einem Multi-Enzym-System in mehreren Schritten ab: Zunächst wird ein Pro-Aktivator entweder durch Endotoxin oder durch andere noch unbekannte Faktoren in seine aktive Form überführt. Der Aktivator bewirkt dann die Umwandlung eines Pro-Enzyms durch begrenzte Proteolyse in das aktive Gerinnungsenzym. In dem nächsten Schritt folgt die begrenzte Proteolyse des Coagulogens durch diese Enzym, dem sich die Polymerisation des entstehenden Coagulins zu einem Gel anschließt.
Dieser Vorgang entspricht dem ersten Schritt der Fibrinogen-Fibrin Umwandlung bei den Vertebraten, der Aggregation von proteolytisch veränderten Fibrinogen-Molekülen (Solum, 1973).
Im Vergleich zu Leucophaea könnte dieser Vorgang dem von uns beobachteten Prozeß der Gel-Bildung aus isolierten Haemocyten, bzw. der Anfangsphase der nativen Gerinnung entsprechen. Das Haemocyten- Coagulogen ist sowohl bei Limulus als auch bei Leucophaea in den Granula der Haemocyten enthalten. Außerdem ist die Ultrastruktur der Blattaria- und Xiphosuren-Granula sehr ähnlich. Die Enzymreaktion allerdings, die bei Limulus das Abspalten eines kurzen Polypeptids vom Coagulogen und das anschließende Polymerisieren des Coagulogens auslöst, ist bei Leucophaea nicht nachgewiesen und nach unseren Untersuchungen zweifelhaft (Bohn and Barwig, in press).

c. Gerinnung bei den Insekten

Bisher sind weder über den Mechanismus noch über biochemische Aspekte der Blutgerinnung bei Insekten Untersuchungen, die den gründlichen Studien bei den Crustaceen oder Xiphosuren entsprechen, durchgeführt worden. Zwar wurden von Grégoire und seinen Mitarbeitern sehr umfangreiche mikroskopische Arbeiten an sehr vielen verschiedenen Insektenarten durchgeführt, diese beschränkten sich aber auf den sichtbaren Teil der Gerinnung (Gré-

goire, 1974).

Die wenigen bisher erschienenen Untersuchungen über die Gerinnungsfaktoren bei Insekten - sie umfassen die nahe verwandten Ordnungen Blattaria und Saltatoria - weisen auf ein Plasma-Protein als Gerinnungsprotein hin. Für die Blattaria, und zwar für Periplaneta americana, zeigte Siakotos (1960) als erster, daß bei der Gerinnung eine Lipoprotein-Fraktion der Haemolymphe verschwindet. Schon 1953 gaben allerdings Bowen und Kilby (1953) für den Vertreter der Saltatoria Schistocerca gregaria einen deutlichen Hinweis auf die Existenz eines Plasma-Gerinnungsproteins. Brehélin (1972; 1979) fand für Locusta migratoria ein Plasma-Gerinnungsprotein als funktionelles Äquivalent zum Säugetier-Fibrinogen.

Vor kurzem erschien von Gellissen (1983) eine Veröffentlichung, in der er ein Lipophorin bei Locusta migratoria, welches er und seine Mitarbeiter in früheren Arbeiten genau untersucht hatten (Gellissen and Wyatt, 1981), auf seine Beteiligung am Gerinnungsprozeß testete. In einem immunologischen Vergleich mit Hilfe von spezifischen Antiseren vor und nach dem Gerinnen der Haemolymphe fand er eine starke Reduzierung der Lipophorin-Fraktion durch die Gerinnungsreaktion. Hieraus und aus der großen Ähnlichkeit von Lipophorinen und Coagulogenen schloß Gellissen, daß beide Proteine identisch sein müßten.

All diese Hinweise auf ein Plasma-Gerinnungsprotein bei den Insekten stimmen mit unseren Ergebnissen bei Leucophaea insofern überein, als wir ebenfalls ein Plasma-Coagulogen eindeutig als Bestandteil des nativen Gerinnsels identifizieren konnten, das in seiner Funktion dem Vertebraten- bzw. Crustaceen-Fibrinogen ähnelt. Darüber hinaus aber haben wir ein zweites Gerinnungsprotein, das aus den Haemocyten stammt, nachweisen können. Ein entsprechendes Protein ist bei den Insekten bisher noch nicht beschrieben worden. Bei den Xiphosuren ist zwar ein Gerinnungsprotein aus den Haemocyten nachgewiesen worden, aber ein Plasma-Gerinnungsprotein ist hier nicht an der Gerinnung beteiligt.

Die Art der Verknüpfung von HC und PC im Clot und eine eventuelle Beteiligung von Enzymen ist bei Leucophaea noch weitgehend unbekannt, obgleich es Hinweise auf eine gewisse Übereinstimmung mit dem System bei den Crustaceen gibt.
Aus allen bisher vorliegenden Ergebnissen könnte man schließen, daß die Gerinnung bei Leucophaea und eventuell bei allen übrigen Insekten eine gewisse Mittelstellung zwischen den beiden Extremen Xiphosuren auf der einen Seite (nur ein Haemocyten-Gerinnungsprotein ist an der Gerinnung beteiligt) und Crustaceen auf der anderen Seite (im wesentlichen ist nur ein Plasma-Gerinnungsprotein an der Gerinnung beteiligt) einnimmt. Weiter könnte man folgern, daß das Gerinnungssystem allgemein im Laufe der Evolution komplexer geworden ist, das heißt, Plasma-Faktoren gegenüber Haemocyten-Faktoren an Bedeutung gewonnen haben. Bei den Arthropoden haben Plasma-Faktoren bei der Gerinnung eine geringere Bedeutung als bei den Vertebraten. So stammt bei den Crustaceen die Fibrinoligase aus den Haemocyten, während die Säugetier-Fibrinoligase ein Plasmabestandteil ist.

3. Charakterisierung des Plasma-Coagulogens (PC) von Leucophaea maderae

Für ein vertieftes Verständnis des Gerinnungsmechanismus bei Leucophaea, besonders der Art der Interaktion der Proteine bei der Gel- und Clot-Bildung, schien es wünschenswert, die beteiligten Proteine zu isolieren und zu charakterisieren. Erforderlich wurde dieser Schritt auch für einen Vergleich mit schon identifizierten Gerinnungsproteinen bei Arthropoden und Vertebraten.
Da die Isolierung des HC mit größeren Schwierigkeiten behaftet schien (HC bildet bei Austritt aus den Granula augenblicklich ein Gel), wurde zunächst die Isolierung des PC in Angriff genommen.

a. Isolierungsmethoden für PC

Eine Methode, PC aus der Haemolymphe zu isolieren, ergab sich im Verlauf der Entwicklung eines Testsystems, mit dem die HC-PC-Interaktion untersucht werden sollte.

Die physiologische Funktion dieses Proteins als Gerinnungsprotein lieferte die Voraussetzung, es mittels einer spezifischen Reaktion von den übrigen Haemolymphbestandteilen zu trennen.

Das auf diese Weise isolierte PC war, abgesehen von Spuren mitausgewaschener Proteine, die nicht näher untersucht wurden, aber wahrscheinlich Haemocyten-Proteine darstellten, fast rein. Ein völlig homogenes Protein konnte durch einen sich anschließenden Reinigungsschritt in der Säulengelfiltration erzielt werden.

Die Homogenität des Proteins wurde mit verschiedenen Methoden, wie Immunelektrophorese, PAGE, SDS-PAGE und Sedimentationsanalyse nachgewiesen.

Da die Ausbeute an isoliertem gereinigtem PC, gemessen an Aufwand und Material, bei der oben beschriebenen Methode relativ gering schien, wurden weitere Isolationsmöglichkeiten untersucht.

Die Ausfällung mit Ammonsulfat erwies sich als ungeeignet, ebenso wie die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der Gelfiltration.

Eine vorläufige Charakterisierung des isolierten PC kennzeichneten es als hochmolekulares Lipoprotein mit beträchtlichen Lipidgehalt. Ein weiteres Haemolymph-Lipoprotein außer PC konnte bei Leucophaea Larven mit spezifischen Färbeversuchen in Immunelektrophorese und PAGE nicht nachgewiesen werden. So lag es nahe, nach einer speziellen Isolationsmethode für Lipoproteine zu suchen.

Lipoproteine zeigen bei geringen Ionenstärken die Tendenz zu aggregieren. Vielfach wurden Lipoproteine durch Zugabe von, oder durch Dialyse gegen Wasser präzipitiert und so von anderen Nicht-Lipoproteinen getrennt. Diese Isolationsmethode wurde auch bei PC angewandt. Der Erfolg blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück. Reines Wasser erwies sich als ungeeignete Präzipitationslösung,

da beträchtliche Schwankungen hinsichtlich der Menge des ausgefällten PC, der mitausgefällten Haemolymph-Proteine und der Möglichkeit, PC wieder in Lösung zu bringen, nichtreproduzierbare Ergebnisse bewirkten. Vermutlich sind unter anderem pH-Schwankungen des destillierten Wassers dafür verantwortlich.
Unter konstanten Bedingungen jedoch, der Dialyse von konzentrierter PC-Lösung gegen eine sehr verdünnte Tris- HCl-Lösung, pH = 5, war diese Präzipitationsmethode auch für PC erfolgreich. Das mit 0.05 M Tris-HCl aufgelöste Präzipitat enthielt aber auch in diesem Fall noch einen gewissen Anteil an Fremdproteinen. Außerdem löste sich nur ein Teil der ausgefällten Proteine. Die Verunreinigungen konnten mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie durch Puffer unterschiedlicher Salzkonzentration abgetrennt werden, wobei noch ein gewisser Verlust an PC eintrat. Insgesamt gesehen war mit diesem Verfahren auch keine allzu große Ausbeute an PC zu erzielen. Der Zeit- und Materialaufwand war jedoch geringer als beim Assoziation-Dissoziations-Verfahren. In beiden Fällen lag PC als homogenes Protein vor.

b. Reaktionsfähigkeit von PC

Es stellte sich die Frage, ob das isolierte PC seine Reaktionsfähigkeit behalten hatte. Denkbar wäre auch eine Veränderung des Proteins durch Schritte bei der Isolation, die bewirkten, daß PC nicht mehr in der Lage ist, mit HC zum Clot zu reagieren.
Die Ergebnisse der Versuche zur Überprüfung dieser Frage fielen zwar nicht ganz eindeutig aus, aber in Anbetracht der Schwierigkeiten, die mit der Methode verbunden waren, kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß sich das isolierte PC nicht vom nativen PC in der Haemolymphe bezüglich seiner Gerinnungsfähigkeit unterscheidet.

c. Molekulargewichtsbestimmungen von PC

Der erste Schritt zur Charkterisierung des PC war der Versuch, das Molekulargewicht des Proteins zu bestimmen. Dabei stellte

sich heraus, daß, je nachdem welche Methode angewandt wurde, unterschiedliche Werte für PC ermittelt werden konnten: In der DCG ein Wert von 480 000 ± 30 000, in der Säulengelchromatographie von 530 000 ± 50 000, in der PAGE von 600 000 ± 50 000 und in der Ultrazentrifuge von 640 000. Die erhebliche maximale Differenz von 200 000 Daltons läßt diese Methoden zunächst als nicht sehr glaubwürdig erscheinen.

Die Vermutung, daß das isolierte Protein selbst in seiner Zusammensetzung schwankt, eventuell aufgrund der Isolationsprozeduren oder aufgrund seiner unterschiedlich großen Nicht-Proteinbestandteile, konnte aus folgendem Grund weitgehend ausgeschlossen werden: Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurde isoliertes PC aus verschiedenen Präparationen verwendet. Die auftretenden Differenzen im Molekulargewicht waren aber nicht mit diesen unterschiedlichen Präparationen gekoppelt, sondern sie waren spezifisch für die jeweils angewandte Methode der Molekulargewichtsbestimmung.

Bei einem Molekül mit einem so hohen Molekulargewicht von mehreren hunderttausend Daltons, das zudem noch einen relativ hohen Lipidanteil und einen geringen Kohlenhydratanteil besitzt, sind den bekannten Verfahren zur Molekulargewichtsbestimmung Grenzen gesetzt. Sowohl in der PAGE, als auch in der Gelfiltration spielen Größen wie Ladung und Gestalt des Moleküls eine nicht unerhebliche Rolle. In der chemischen Zusammensetzung vergleichbare Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung sind praktisch nicht erhältlich. Diese Verfahren führen also nur zu einer relativ groben Abschätzung des Molekulargewichts. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich die Methode des Sedimentationsgleichgewichtslaufs in der Ultrazentrifuge angewandt. Mit ihrer Hilfe kann das Molekulargewicht relativ genau bestimmt werden, vorausgesetzt, das partielle spezifische Volumen ($\bar{V}$) des Proteins ist bekannt. 1% Fehler bei der $\bar{V}$ Bestimmung würden sich in 3% Fehler beim Molekulargewicht niederschlagen. Normalerweise wird für Proteine ein Durchschnittswert von $\bar{V} = 0.74$ angenommen. Bei zusammenge-

setzten Proteinen aber, wie auch PC eins darstellt, gibt es erhebliche Abweichungen von diesem Wert. Das $\overline{V}$ muß dann berechnet oder durch Messung bestimmt werden. Da $\overline{V}$-Messungen mit relativ großem Aufwand verbunden sind, wurde für PC das $\overline{V}$ mit $\overline{V} = 0.896$ so genau wie möglich berechnet, unter der Annahme, daß sich das $\overline{V}$ des Gesamtmoleküls aus der Summe der $\overline{V}$ seiner Bestandteile berechnet. Das hiermit bestimmte Molekulargewicht von 640 000 dürfte dem wahren Wert am nähesten kommen. Dieses Ergebnis stimmt außerdem recht gut überein mit dem in der PAGE bestimmten Wert von 600 000 $\pm$ 50 000.

d. Der Aufbau von PC aus Untereinheiten

Wie die meisten hochmolekularen Proteine, ist auch PC aus Untereinheiten aufgebaut. Es konnten zwei ihrer Größe nach unterschiedliche Untereinheiten identifiziert werden, PC 1 mit einem Molekulargewicht von 320 000 und PC 2 mit 76 000. Die Frage, in welchem Mol-Verhältnis die beiden Polypeptidketten im PC-Molekül miteinander verknüpft sind, konnte nicht befriedigend geklärt werden. Es könnten eine oder zwei PC 2-Untereinheiten mit einer PC 1-Untereinheit verbunden sein. Bei der Auftrennung der Untereinheiten in der SDS-PAGE war kein Unterschied sichtbar zwischen nativem PC und dem Apoprotein.

e. Chemischer Aufbau des PC

Die Aminosäureanalyse des PC wurde nur mit dem nativen Protein durchgeführt. Es wäre jedoch wünschenswert, auch die Aminosäurezusammensetzung der beiden Untereinheiten zu bestimmen, um eventuell vorhandene Unterschiede zu erfassen. Der erhebliche Größenunterschied zwischen den beiden Polypeptidketten ließe auch eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung vermuten.
Bei der Aminosäurezusammensetzung des Gesamtmoleküls fällt der relativ hohe Gehalt an negativ geladenen (sauren) Aminosäuren, wie Asparagin/Asparaginsäure und Glutamin/Glutaminsäure, sowie an unpolaren Aminosäuren wie Valin, Leucin und Glycin, auf.

Der für ein so großes Protein relativ kleine Sedimentationskoeffizient von s_{app} = 7,7 und die Anfärbbarkeit mit Sudan Schwarz in Immunelektrophorese und PAGE gaben erste Hinweise auf den hohen Lipidanteil im PC. Die Untersuchungen ergaben einen 50%igen Lipidgehalt, wobei die Phospholipide mit 33.1% neben den Diglyceriden mit 18.7% die stärkste Lipidfraktion stellten.
Die Färbeversuche von PC mit dem PAS-Reagens deuteten auf einen Kohlenhydratanteil hin, ließen zunächst aber keine eindeutigen Rückschlüsse zu, da sich alle Plasma-Proteine verschieden stark anfärbten. Bei der photometrischen Bestimmung mit Hilfe der Anthron-Methode wurde ein sehr geringer Anteil (0.8%) an Kohlenhydrat im PC-Molekül gefunden. Dieser niedrige Wert ist allerdings in Frage zu stellen, da er an der Nachweisgrenze liegt.

4. Vergleich von PC mit anderen Gerinnungsproteinen

Bei den Arthropoden ist bisher von den Insekten nur für Locusta migratoria ein Plasma-Gerinnungsprotein genauer beschrieben worden (Brehelin, 1979). Brehelin sah das von ihm gefundene Gerinnungsprotein als funktionelles Äquivalent zum Säugetier-Fibrinogen. Es stellt einen Glycolipo-Proteinkomplex dar, dessen Molekulargewicht zwischen 590 000 und 600 000 liegt. In der SDS-PAGE fand er sechs Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 52 000 bis 150 000.
Das PC von Leucophaea ist, das Molekulargewicht und den Lipid- und Kohlenhydratgehalt betreffend, mit diesem Protein vergleichbar, in der Untereinheiten-Struktur aber weicht es erheblich von diesem ab. Allerdings ist ein genauer Strukturvergleich nicht möglich, da genauere chemische Untersuchungen, zum Beispiel vom Lipidgehalt, nicht vorgenommen worden sind.
Das bisher am weitgehendsten analysierte Plasma -Coagulogen bei den Arthropoden ist das Crustaceen-'Fibrinogen', wobei hauptsächlich Doolittle und Fuller (1972) sich um die Aufklärung der Gerinnungsprotein-Struktur bei Panulirus interruptus bemühten. Da-

nach besteht dieses Crustaceen-'Fibrinogen' mit einem Molekulargewicht von 420 000 aus zwei Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Außerdem sind ein Kohlenhydratanteil von 3% und ein Lipidanteil von 5% vorhanden.
Wie man sieht, unterscheidet sich dieses Plasma-Gerinnungsprotein beträchtlich vom Leucophaea-PC, sowohl in seiner Struktur, als auch in seiner chemischen Zusammensetzung. Beide Coagulogene wiederum sind vollkommen verschieden von dem bisher am gründlichsten erforschten Gerinnungsprotein überhaupt, dem menschlichen Fibrinogen.
Dieses Molekül mit einem Molekulargewicht von 340 000 besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die wiederum aus drei nichtidentischen Polypeptidketten zusammengesetzt sind. Alle Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Ein geringer Kohlenhydrat-und Lipidanteil sind ebenfalls vorhanden. Dieses Protein ist sehr widerstandsfähig gegenüber der Verdauung durch proteolytische Enzyme.
Der Vergleich von Leucophaea-PC mit den wenigen bekannten Plasma-Gerinnungsproteinen der Arthropoden zeigt zum einen, daß innerhalb der Arthropoden zwischen den verschiedenen Klassen wie Crustaceen und Insekten keinerlei biochemische Übereinstimmung von den ihrer Funktion nach ähnlichen Plasma-Coagulogenen existiert. Daraus könnte man folgern, daß diese Proteine in der Evolution unabhängig voneinander entstanden sind. Zum anderen deuten die beträchtlichen Unterschiede dieser Proteine zum Vertebraten -Fibrinogen auf eine unabhängig voneinander verlaufene Evolution der Gerinnungsproteine und eventuell auch der Systeme von Vertebraten und Invertebraten hin.

5. Vergleich von PC mit Lipophorinen

PC von Leucophaea zeigt große Übereinstimmung in seiner physikalischen und chemischen Zusammensetzung mit einer anderen bekannten Klasse von Plasma-Lipoproteinen der Insekten, den Lipopho-

rinen. Lipophorine (Chino and Kitazawa, 1981) ist die Bezeichnung für eine Gruppe von Lipid-Transportproteinen, die früher auch als diglyceride-binding lipoproteins (DGLPs) oder high density lipoproteins (HDLs) bezeichnet wurden. In Tab. 10 sind die wichtigsten Charakteristika einiger dieser Lipophorine aufgelistet, zusammen mit Leucophaea-PC, um einen übersichtlichen Vergleich zu ermöglichen.

Für einige wenige Insektenarten der Blattaria (Chino et al., 1981), Saltatoria (Chino and Kitazawa, 1981; Gellissen and Emmerich, 1980) und Lepidoptera (Chino et al., 1969; Pattnaik et al., 1979; Peled and Tietz, 1975; Thomas and Gilbert, 1968) sind bisher diese Lipophorine gründlich untersucht worden. Die Tabelle zeigt auf den ersten Blick erstaunliche Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Insektenarten in der Molekularstruktur und dem Aufbau dieser Proteine und dem PC.

Allen Lipophorinen und dem PC gemeinsam ist ein hohes natives Molekulargewicht von einigen hunderttausend Daltons. Die hierbei sichtbaren Abweichungen, auch für ein und dasselbe Protein, wie zum Beispiel bei Locusta migratoria von 460 000, bestätigen die schon diskutierten Schwierigkeiten, ein so hohes Molekulargewicht von einem Protein, das darüber hinaus noch einen beträchtlichen Lipidanteil besitzt, genau zu bestimmen. In Anbetracht dieser Unsicherheiten scheint ein Molekulargewicht im Bereich von 600 000-650 000 für die Lipophorine am wahrscheinlichsten. Dieser Wert würde mit dem von uns ermittelten Wert von 640 000 für PC recht gut übereinstimmen.

Im weiteren Vergleich mit den Lipophorinen zeigten sich Parallelitäten in der Untereinheiten-Struktur. Zwei verschiedene Größenklassen von Untereinheiten scheinen ein allgemeines Kennzeichen von Insekten-Lipophorinen zu sein, wobei die Molekulargewichte dieser Untereinheiten in gewissen Grenzen schwanken.

Gellissen und Wyatt allerdings kamen in ihrer Untersuchung über Locusta-Lipophorin zu einem anderen Ergebnis (Gellissen and Wyatt, 1981). Sie fanden nur eine Untereinheit von 85 000 Dal-

Tab. 10

Physikalische und chemische Eigenschaften von PC

Zum Vergleich sind die Werte einiger Lipophorine (DGLPs;HDLs) aufgeführt.

Protein	Lipid-anteil (%)	Kohlenhydrat-anteil (%)	$\bar{V}$	$s_{20,w}$	Molekulargewicht natives	Molekulargewicht Unter-einheit
PC	**50.3**	**0.8**	**0.896**	**7.7**[8]	**500 000 -640 000**	**320 000 76 000**
Lipophorin[1] (cockroach)	49.6	0.9	0.87	7.5	600 000	250 000 85 000
Lipophorin[2] (locusta)	36	1	0.85	7.5	700 000 -850 000	(200 000) 85 000
[3]	26.5 36.6	nb[9]	0.82 0.85	6.9	340 000	mehrere versch. U.Einh.
[4]	41	3	0.87	nb[9]	580 000	250 000 85 000
Lipophorin[5] (silkworm)	44	+	0.87	9.4	690 000	370 000 88 000
LPI (HDL)[6] (silkmoth)	48	-	0.892	8.7	189 000	nb[9]
HDL[7] (tobacco hornworm)	37	2	0.875	8.75	600 000	285 000 81 000

[1] Periplaneta americana (Chino et al., 1981)
[2] Locusta migratoria (Gellissen and Emmerich, 1980)
[3] Locusta migratoria, (Pelet and Tietz, 1975)
[4] Locusta migratoria (Chino and Kitizawa, 1981)
[5] Philosamia cyntia (Chino et al., 1969)
[6] Hyalophora cecropia (Thomas and Gilbert, 1968)
[7] Manduca sexta (Pattnaik et al., 1979)
[8] unkorrigierter Wert s_{app}
[9] nicht bestimmt

tons, wenn das Protein direkt aus der Haemolymphe verwendet wurde oder durch Gelfiltration isoliert wurde. Ein hochmolekulares Produkt von 240 000 trat nur in Präparationen auf, bei denen ein Präzipitationsschritt stattfand. Aus diesem Grunde sahen die Autoren die große 'Untereinheit' als ein Aggregationsprodukt der kleineren Untereinheit an.

Inwieweit diese Daten auf Leucophaea-PC und die Lipophorine übertragbar sind, läßt sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht entscheiden. Dagegen spricht, daß im Falle des Leucophaea-PC sowohl präzipitiertes als auch dissoziiertes PC nach SDS-Behandlung beide Untereinheiten ergibt, und die aus dem SDS-Gel isolierten Untereinheiten nach erneutem Auftrennen in der SDS-PAGE wieder die gleichen Banden zeigen. Allerdings muß eingeschränkt werden, daß durch die Verwendung von 0,05 M Tris-HCl bei beiden Isolationsverfahren ein Teil der niedermolekularen Untereinheit PC 2 aggregiert sein könnte. Gewißheit darüber, ob eine oder zwei verschiedene Untereinheiten vorliegen, könnten genauere Untersuchungen der Untereinheiten auf Identität, zum Beispiel durch Aminosäureanalyse oder durch immunologische Verfahren geben.

Ein Vergleich der Aminosäuredaten von PC und Lipophorinen dreier Insektenarten (siehe Tab. 9) zeigt ebenfalls gute Übereinstimmung in der Aminosäurezusammensetzung.

Der Lipidanteil in allen in Tab. 10 aufgelisteten Lipophorinen ist relativ hoch mit Werten von 27-50,3%. Der 50,3%ige Lipidanteil bei Leucophaea-PC stimmt erstaunlich gut mit dem für Periplaneta-Lipophorin ermittelten Wert von 49,6% überein.

Die Lipidzusammensetzung der Lipophorine, hier nicht im einzelnen dargestellt, zeigt im allgemeinen einen hohen Anteil an Phospholipiden, wie er auch bei PC zu finden ist. Der Hauptbestandteil der neutralen Lipide ist in allen Fällen, auch bei PC, die Diglycerid-Fraktion. In Bezug auf die Lipophorine ist dies nicht verwunderlich, denn diese Proteine dienen hauptsächlich als Transportmoleküle für Diglyceride. Für PC stellt sich aus diesem Grun-

de die Frage, ob es nicht dieselbe Funktion erfüllt.
Die große Übereinstimmung auch in den anderen in Tab. 10 angegebenen Größen, wie partielles spezifisches Volumen, Sedimentationskoeffizient oder Kohlenhydratanteil, sowohl bei Lipophorinen, als auch bei PC, verstärkt den Verdacht, daß Lipophorine und PC identisch sind.

6. Diskussion der physiologischen Funktionen von PC

Chino und Mitarbeiter untersuchten die physiologische Rolle von verschiedenen Insekten-Lipophorinen (Chino and Kitazawa, 1981). Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten sie diese Proteine als Transportmoleküle identifizieren, die mehrere Funktionen gleichzeitig ausführen: Nicht nur Diglyceride, sondern auch Kohlenwasserstoffe und höchstwahrscheinlich Cholesterin und Carotinoide werden transportiert. Diese Stoffe werden von den Orten, wo sie synthetisiert oder gespeichert werden, bzw. absorbiert sind, aufgenommen und dahin gebracht, wo sie zur Energielieferung gebraucht werden. Dabei ist ein Molekül für diese Funktion wiederholt verwendbar.
Wenn PC ebenfalls ein Lipophorin darstellen sollte, was sehr wahrscheinlich ist, zum einen durch die erstaunlich großen Ähnlichkeit im Aufbau, zum anderen durch die Tatsache, daß es das einzige Plasma-Lipoprotein von Leucophaea darstellt, so müßte eine Funktion des Leucophaea-PC auch im Lipidtransport bestehen. Eine interessante Aufgabe wäre es, dieser Hypothese nachzugehen und eine Transportfunktion des Moleküls nachzuweisen.
Andererseits könnte man vermuten, daß alle bisher identifizierten Lipophorine auch als Gerinnungsproteine in Frage kämen. Schon Brehélin (1979) erwähnte die mögliche Doppelfunktion von Locusta-Coagulogen beim Lipidtransport und der Blutgerinnung. Gellissen fand, wie schon erwähnt, in einer immunologischen Untersuchung von Locusta-Lipophorin vor und nach dem Gerinnen einen deutlichen Hinweis dafür, daß dieses Protein mit Plasma-Coagulogen

identisch ist (Gellissen, 1983).

Falls sich der Verdacht betätigen sollte, daß bei Leucophaea und eventuell bei anderen Insektenarten das Lipophorin mit Plasma-Coagulogen identisch ist, stellen sich viele Fragen bezüglich der Tatsache, daß ein und dasselbe Molekül zwei völlig verschiedene Funktionen, wie sie Lipidtransport und Gerinnung darstellen, innehaben kann. Gibt es zum Beispiel Hinweise dafür, daß innerhalb der Insekten eine Trennung dieser beiden Funktionen auf unterschiedliche Proteine stattfand? Zur Beantwortung dieser Frage wäre ein intensiveres Studium der Gerinnungs-und Lipidtransport-Mechanismen bei Insekten notwendig.

Betrachtet man die Struktur des Leucophaea-PC unter dem Gesichtspunkt der Gerinnungsfunktion, so könnte man dem hohen Lipidanteil eine mögliche Funktion im Gerinnungsprozeß zuschreiben, zum Beispiel bei der Stabilisierung des Gerinnungsnetzwerkes. Auch der Aufbau aus zwei verschiedenen Polypeptidketten führt zu Spekulationen über deren Beteiligung an der Gerinnung bzw. am Lipidtransport: Welchen Beitrag leisten die jeweiligen Untereinheiten zur Gerinnungs-und Lipidtransportfunktion des Gesamtmoleküls? Bei der Gerinnung wären zwei Varianten vorstellbar: Zum einen könnte das Gesamtmolekül an der Interaktion mit dem HC beteiligt sein, zum anderen aber wäre auch die Verknüpfung nur einer der beiden Polypeptidketten mit dem HC im nativen Gerinnsel denkbar. Weitere intensive Studien der Interaktion von PC und HC könnten unter anderem zur Klärung dieser Frage beitragen.

E. Zusammenfassung

1. Immunologische Untersuchungen der Haemolymphgerinnung der Schabe Leucophaea maderae brachten folgende Ergebnisse:
a. Isolierte Haemocyten können ohne die Beteiligung von Plasma ein Gel, das sogenannte Haemocyten-Gel bilden. Dieses enthält Haemocyten-Coagulogen (HC), eines der beiden an der Gerinnung beteiligten Coagulogene.
b. Bei der nativen Gerinnung bildet sich in Anwesenheit von Plasma ein festes Gerinnsel, das Haemolymph-Clot. Dieses enthält zwei verschiedene Gerinnungsproteine: Haemocyten-Coagulogen (HC) und Plasma-Coagulogen (PC).

2. Der Vergleich von Plasma und Serum in Immunelektrophorese und PAGE zeigt:
a. Im Plasma ist im Vergleich zum Serum ein zusätzliches Protein enthalten. Dieses läßt sich spezifisch mit Sudan Schwarz anfärben und zeichnet sich durch eine geringe Wanderungsgeschwindigkeit im Gel aus.
b. Dieses im Serum fehlende Protein stellt das Plasma-Gerinnungsprotein, PC, dar.

3. In-vitro-Studien über die Art der Interaktion beider Coagulogene im Clot besagen folgendes:
a. Die Gerinnung ist eine sehr schnell ablaufende Reaktion, die wahrscheinlich innerhalb von 3 min abgeschlossen ist.
b. Die Kombination von Haemocyten und Plasma, wie auch von Haemocyten und isoliertem PC, führt unter bestimmten Reaktionsbedingungen zu einem Clot, das dem nativen Gerinnsel entspricht.
c. Die Kombination von Haemocyten-Gel und Plasma bei niedrigen Ionenstärken führt zu einer spezifischen Assoziation von HC und PC, also nicht zu einer echten Gerinnung. Vermutlich entspricht das Assoziat einer Vorstufe des natürlichen Gerinnungsprozesses. Die Gerinnungsaktivität des HC nimmt wahrscheinlich durch einen

Alterungsprozeß bei der Gel-Bildung rapide ab.

4. Die bei geringen Ionenstärken erfolgte Assoziation von PC und HC ist bei höheren Ionenstärken oder stark alkalischem pH reversibel. Durch Dissoziation des PC mit hochmolarem Tris Puffer aus dem Assoziat und durch anschließende Gelfiltration gelang die Isolation von PC.

5. Präzipitation von PC aus dem Plasma bei geringen Ionenstärken und anschließende Ionenaustauschchromatographie stellten eine weitere Isolationsmethode für PC dar.

6. Die Homogenität des isolierten PC ließ sich mit folgenden Verfahren nachweisen: In der Immunelektrophorese war nur ein Präzipitat, in der PAGE nur eine Bande sichtbar. Mehrere Sedimentationsläufe in der Ultrazentrifuge zeigten, daß es sich um ein Protein mit s_{app} = 7,7 handelte.

7. Eine Charakterisierung des PC ergab:
a. PC ist ein Lipoprotein mit einem Lipidgehalt von 50%. Die Lipidzusammensetzung zeigte einen hohen Anteil an Phospholipiden (33,1%) und an Diglyceriden (18,7%). Ein 0.8%iger Kohlenhydratanteil scheint ebenfalls vorhanden zu sein.
b. Das native Molekulargewicht von PC beträgt 640 000 nach der Bestimmung durch Yphantis-Läufe in der Ultrazentrifuge.
c. In der SDS-PAGE konnten zwei ihrem Molekulargewicht nach unterschiedliche Polypeptidketten identifiziert werden: PC 1 mit 320 000 und PC 2 mit 76 000 Daltons.
d. Die Aminosäureanalyse des Gesamt-Proteins zeigte relativ hohe Werte von Glutamin/Glutaminsäure, Asparagin/Asparaginsäure, sowie von Valin, Leucin und Glycin.
e. Der PC-Anteil am Gesamt-Plasma beträgt etwa 15%.

8. PC ist in seinem Aufbau den Lipophorinen, einer bestimmten Gruppe von Transportproteinen der Insekten, sehr ähnlich. Das legt die Vermutung nahe, Plasma-Coagulogene und Lipophorine von Insekten könnten identisch sein.

F. Literatur

Andrews, P.: Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In: Methods of biochemical analysis.
Interscience Publishers, New York, London. 18, 1-53 (1970)

Arnold, J.W.: The hemocytes of insects. In: Rockstein M (ed) The physiology of insecta, 2 nd ed, vol 5.
Academic Press, New York, pp 201-254 (1974)

Barwig, B., Bohn, H.: Evidence for the presence of two clotting proteins in insects.
Naturwissenschaften 67, 47 (1980)

Bauchau, A., De Brouwer, M.-B.: Etude ultrastructurale de la coagulation de l'hémolymphe chez les crustacés.
J. Microsc. 19, 37-46 (1974)

Bauchau, A.G., Mengeot, J.C.: Structure et fonction des hemocytes chez les crustaces.
Arch. Zool. Exp. Gen. 119, 227-248 (1978)

Bohn, H., Barwig, B.: Hemolymph clotting in the cockroach Leucophaea maderae (Blattaria). Influence of ions and inhibitors; isolation of the plasma coagulogen.
J. Comp. Physiol. (in press)

Bohn, H., Barwig, B., Bohn, B.: Immunochemical analysis of hemolymph clotting in the insect Leucophaea maderae (Blattaria).
J. Comp. Physiol. 143, 169-184 (1981)

Bowen, T.J., Kilby, B.A.: Electrophoresis of locust hemolymph.
Arch. Int. Physiol. 61, 413-416 (1953)

Brehélin, M.: Etude du mecanisme de la coagulation de l'hémolymphe d'un Acridien: Locusta migratoria migratorioides (R.&F.).
Acrida 1, 167-175 (1972)

Brehélin, M.: Hemolymph coagulation in Locusta migratoria: Evidence for a functional equivalent of fibrinogen.
Comp. Biochem. Physiol. 62B, 329-334 (1979)

Chino, H., Katalase, H., Downer, R.G.H., Takahashi, K.: Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the American cockroach: Purification and function.
J. Lipid Res. 22, 7-15 (1981)

Chino, H., Kitizawa, K.,: Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects.
J. Lipid Res. 22, 1042-1052 (1981)

Chino, H., Murakami, S., Harashima, K.: Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph: isolation, purification and properties.
Biochim. Biophys. Acta 176, 1-26 (1969)

Clark, W.M.: Studies on blood cell types and clotting reactions in a selected crustacean (Cambarus sp.).
J. Sci. 22, 282 (1971)

Cohn, E.J., Edsall, J.T.: Proteins, amino acids and peptides.
Reinhold, New York, p 375 (1950)

Crossley, A.C.: The cytophysiology of insect blood.
Adv. in Insect Physiol. 11, 117-221 (1975)

Doolittle, R.F., Fuller, G.M.: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis studies on lobster fibrinogen and fibrin.
Biochim. Biophys. Acta 263, 805-809 (1972)

Dumont, J.N., Anderson, E., Winner, G.: Some cytological characteristics of the hemocytes of Limulus during clotting.
J. Morphol. 119, 181-208 (1966)

Durliat, M., Vranckx, R.: Coagulation in the crayfish, Astacus leptodactylus: Attempts to identify a fibrinogenlike factor in the hemolymph.
Biol. Bull. 151, 467-477 (1976)

Durliat, M., Vranckx, R.: Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters.
Biol. Bull. 160, 55-68 (1981)

Elias, H.G.: Ultrazentrifugen-Methoden.
München: Beckman Instruments GmbH, (1969)

Folch, I., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)

Franke, H.: Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Blutgerinnung bei Periplaneta orientalis.
Zool. Jahrb. 68, 499-518 (1960)

Freemann, C.P., West, D.: Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate.
J. Lipid Res. 7, 324-327 (1966)

Fuller, G.M., Doolittle, R.F.: Studies on invertebrate fibrinogen. I Purification and characterization of fibrinogen of the spiny lobster. II Transformation of lobster fibrinogen into fibrin.
Biochem. 10, 1305-1315 (1971)

Gaffin, S.L.: The clotting of the lysed white cells of Limulus induced by endotoxin. I Preparation and characterization of clot-forming proteins.
Biorheology 13, 273-280 (1976)

Gellissen, G.: Lipophorin as a plasma coagulogen in Locusta migratoria.
Naturwissenschaften 70, 45-46 (1983)

Gellissen, G., Emmerich, H.: Purification and properties of a diglyceride-binding lipoprotein (LPI) of the hemolymph of adult male Locusta migratoria.
J. Comp. Physiol. 136, 1-9 (1980)

Gellissen, G., Wyatt, G.R.: Production of lipophorin in the fat body of adult Locusta migratoria: comparison with vitellogenin.
Can. J. Biochim. 59, 648-654 (1981)

Ghidalia, W., Vendrely,R., Montmory, C., Coirault, Y.: Cross induced coagulation between human and crustaceen clotting factors. Considerations on the clotting processes.
Comp. Biochem. Physiol. 72A, 741-745 (1982)

Grabar, P., Williams, C.A.: Méthode permettant l'étude conjugée des proprietés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de proteines; application au serum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 10, 193 (1953)

Grégoire, C.: Blood coagulation in Arthopods. III Reactions of insect hemolymph to coagulation inhibitors of vertebrate blood.
Biol. Bull. 104, 372-393 (1953)

Grégoire, C.: Hemolymph coagulation in arthropods.
Symp. Zool. Soc. Lond. 27, 45-74 (1970)

Grégoire, C.: Hemolymph coagulation. In: Rockstein M (ed) The physiology of insecta, vol 5.
Academic Press, New York, pp 309-360 (1974)

Grégoire, C., Florkin, M.: Blood coagulation in arthropods. I The coagulation of insect blood, as studied with the phase contrast microscope.
Physiologia Comp. Oecol. 2, 126-139 (1950)

Grégoire, C., Goffinet, G.: Controversies about the coagulocyte. In: Gupta AP (ed) Insect haemocytes.
Cambridge University Press, Cambridge, pp 189-229 (1979)

Jones, J.C.: Current concepts concerning insect hemocytes.
Am. Zool. 2, 209-246 (1962)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature (London) 227, 680-685 (1970)

Landureau, C.-J., Grellet, F.: Nouvelles techniques de culture in vitro de cellules d'insectes et leurs application.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 274, 1372-1375 (1972)

Levin, J., Bang, F.B.: Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin.
Thromb. Diathes. Haemorrhag. 19, 186-192 (1968)

Liu, T.-Y., Seid, R.C., Tai, J.Y., Liang, S.-M., Sakmar, T.R., Robbins, J.B.: Studies on Limulus lysate coagulating system.
Progr. Clin. Biol. Res. 29, 147-158 (1979)

Lorand, L.: Fibrinoligase: The fibrin-stabilizing factor system of blood plasma.
Am. N. Y. Acad. Sci. 202, 7-30 (1972)

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Mengeot, J.C., Bauchau, A.G., De Brouver, M.-B., Passelecq-Gerin, E.: Isolement des granules des hémocytes de Homarus vulgaris. Examens électrophorétiques du contenu proteique des granules.
Comp. Biochem. Physiol. 58A, 393-403 (1977)

Miettinen-Baumann, A.: Untersuchungen zur Haemolymph-Gerinnung beim Flußkrebs (Astacus leptodactylus).
Diplomarbeit, Universität München, 1984

Nakamura, S., Levin, J.: Fractionation of Limulus amebocyte lysate. Characterization of activation of the proclotting enzyme by an endotoxin-mediated activator.
Biochim. Biophys. Acta 707, 217-225 (1982)

Nakamura, S., Morita, T., Harada-Suzuki, T., Iwanaga, S., Takahashi, K., Niwa, M.: A clotting enzyme associated with the hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Tachypleus tridentatus): Its purification and characterization.
J. Biochem. 92, 781-792 (1982)

Ohki, M., Nakamura, T., Morita, T., Iwanaga, S.: A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Limulidae).
FEBS Lett. 120, 217-220 (1980)

Pattnaik, N.M., Mundall, E.C., Trambusti, B.G., Law, J.H., Kezdy, F.J.: Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of Manduca sexta.
Comp. Biochem. Physiol. 63B, 469-476 (1979)

Peled, Y., Tietz, A.: Isolation and properties of a lipoprotein from the hemolymph of the locust, Locusta migratoria.
Insect Biochem. 5, 413-416 (1975)

Prat, J.P., Lamy, J.N., Weill, J.D.: Coloration des lipoproteines aprẽs électrophorẽse en gel de polyacrylamide.
Bull. Soc. Chim. Biol. 51, 1367 (1969)

Roe, J.R.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with the anthrone reagent.
J. Biol. Chem. 212, 335-343 (1955)

Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A.: The granular cells of Galleria mellonella during clotting and phagocytic reactions in vitro.
Tissue Cell 8, 437-446 (1976)

Schwick, G., Störiko, K.: Qualitative und quantitative Plasmaproteinbestimmung durch Immunpräzipitation.
Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik, Behringwerke (1964)

Siakotos, A.N.: The conjugated plasma proteins of the American cockroach. II Changes during the molting and clotting process.
J. Gen. Physiol. 43, 1015-1030 (1960)

Söderhäll, K.: Fungall cell wall β-1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate.
Develop. Comp. Immunol. 5, 565-573 (1981)

Solum, N.O.: The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A comparison of clotted and non clotted forms of the molecule.
Thromb. Res. 2, 55-70 (1973)

Stewart, J. E., Dingle, J.R., Odense, P.H.: Constituents of the hemolymph of the lobster, Homarus americanus Milne Edwards.
Can. J. Biochem. 44, 1447-1459 (1966)

Stutman, L.J., Dolliver, M.: Mechanism of coagulation in Gecarcinus lateralis.
Am. Zool. 8, 481-489 (1968)

Thomas, K.K., Gilbert, L.I.: Isolation and characterization of the haemolymph lipoproteins of the American silkmoth, Hyalophora cecropia.
Arch. Biochem. Biophys. 127, 512-521 (1968)

Uriel, J.: In: Grabar, P.Burtin (Eds.) Immunoelectrophoretic Analysis
Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York 30 (1964)

Weber, J.: Versuche zur Blutgerinnung der Schabe Leucophaea maderae (Fabr.).
Zulassungsarbeit zum Staatsexamen, Univ. München (1980)

Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Weeke, B.: Crosses immunoelectrophoresis.
Scand. J. Immunol. 2, 47-56 (1973)

Young, N.S., Levin, J., Pendergast, R.A.: An invertebrate coagulation system activated by endotoxin. Evidence for enzymatic mediation.
J. Clin. Invest. 51, 1790-1797 (1972)

Yphantis, D.A.: Rapid determination of molecular weights of peptides and proteins.
Am. N. Y. Acad. Sci. 88, 586-601 (1960)

Yphantis, D.A.: Equilibrium ultrazentrifugation of dilute solutions.
Biochemistry 3, 297-317 (1964)

Lebenslauf

geboren am:	03.04.1950
in:	Haltern
Familienstand:	seit 1978 verheiratet, zwei Kinder
Schulbildung:	1956 bis 1960 Grundschule in Gladbeck 1960 bis 1967 Neusprachliches Mädchengymnasium in Gladbeck 1967 bis 1969 Elsa-Brandström-Gymnasium in München Abschluß: Abitur Juni 1969
Berufsausbildung:	1969 bis 1971 Ausbildung zur Ingenieurassistentin auf der Technischen Schule der Fa. Siemens AG in München
Berufstätigkeit:	Okt. 1971 bis Dez. 1972 Ingenieurassistentin bei Fa. Siemens AG in München Jan. 1973 bis Okt. 1973 Technische Assistentin am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried Feb. 1982 bis Feb. 1984 Wissenschaftliche Angestellte am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen eines DFG Projektes
Studium:	1973 bis 1978 Biologie und Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Herbst 1978 Staatsexamen in Biologie/Chemie ab Feb. 1979 Promotionsstudium